



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de la diversidad y predicción del potencial genético funcional de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera del mangle negro (*Avicennia germinans*) en un gradiente de salinidad de La Guajira

Ingrid Paola Figueroa Galvis

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá D.C., Colombia
2017

Caracterización de la diversidad y predicción del potencial genético funcional de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera del mangle negro (*Avicennia germinans*) en un gradiente de salinidad de La Guajira

Ingrid Paola Figueroa Galvis

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias Microbiología

Director

PhD., Javier Vanegas Guerrero

Codirector

PhD., Q.F. Fabio Ancízar Aristizabal

Línea de Investigación: Microbiología Ambiental

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá D.C., Colombia

2017

A Jesucristo

*Quien me da la vida y la Palabra que necesito
para avanzar cada día al propósito divino.*

A Andrés

*Por ser el instrumento que trae amor y paz a
mi vida.*

A mi Madre

*Quien ha plantado semillas de amor,
integridad y fortaleza que prevalecen aún en
los momentos difíciles.*

Agradecimientos

A COLCIENCIAS, a la Universidad Antonio Nariño y a la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del presente trabajo.

Al profesor Javier Vanegas Guerrero, por la dirección de este trabajo, por su confianza, colaboración, gran paciencia y amistad.

Al posgrado de Microbiología y a la profesora Marta Raquel Fontanilla por sus consejos para desarrollar con éxito esta investigación. A Socorro Prieto, por su gran amabilidad y disposición para brindarme su ayuda oportuna.

Al profesor Fabio Aristizabal por sus aportes y acompañamiento en el desarrollo del presente trabajo. Al profesor Silvio López por sus contribuciones a la presente investigación como parte del comité asesor del proyecto COLCIENCIAS de la Universidad Antonio Nariño.

A Johanna Boyacá por su colaboración para que todo lo necesario para el desarrollo de este trabajo estuviera disponible.

A los integrantes del grupo de investigación de investigación en Caucho, por permitir que el laboratorio se convirtiera en mi segundo hogar.

A Guillermo Torres por su apoyo para el análisis de datos y aclarar las ideas cuando parecían confusas. Especialmente a Orson Mestanza, por su apoyo y amistad. A Andrea Muñoz y Alejandra Pérez por el gran apoyo brindado y el aporte investigativo que hizo posible este trabajo.

De forma muy especial a la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres y a su presidenta Ángela María Cáceres de Gutiérrez por su apoyo y solidaridad.

A Andrés Ramos por su amor, su apoyo incondicional y por renovar mis fuerzas diariamente. A mi familia por su sacrificio y compañía durante este tiempo.

Resumen.

Los suelos de manglar poseen una alta actividad microbiana, la cual se encarga de realizar el ciclaje de nutrientes y asimismo sustenta la cadena trófica. El objetivo principal del presente trabajo fue identificar la diversidad y predecir el potencial genético funcional de las comunidades microbianas, presentes en el suelo rizosférico del mangle negro (*Avicennia germinans*), a lo largo del gradiente de salinidad. El lugar de estudio se ubicó en el manglar de la desembocadura del río Ranchería, en el departamento de La Guajira. El trabajo se dividió en tres objetivos: 1. Determinar la diversidad de microorganismos presentes en las tres zonas de muestreo mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. 2. Evaluar el efecto de las características fisicoquímicas del suelo sobre la diversidad taxonómica de las comunidades microbianas. 3. Predecir el potencial funcional microbiano, utilizando el software PICRUSt. Se identificó la diversidad y estructura de la comunidad de bacterias y archaeas, siendo la abundancia de bacterias más alta. Se encontraron diferencias significativas en 161 especies bacterianas a lo largo del gradiente de salinidad del suelo. Las variables fisicoquímicas del suelo carbono orgánico, arcilla y salinidad afectaron la distribución de OTUs. Mediante la predicción PICRUSt se identificaron diferencias significativas en los genes *betA*, *betB*, *otsA*, *otsB*, *otsA otsB* y *proB* relacionados a tolerancia al estrés por salinidad. En conclusión, este trabajo presenta una visión de la diversidad microbiana presente en un manglar de La Guajira, las variables ambientales que afectan la diversidad y la predicción de funciones metabólicas que se pudieran estar llevarse a cabo.

Palabras clave: 16S rRNA, diversidad microbiana, rizósfera, manglar, *Avicennia germinans*.

Abstract.

Mangrove soils have high microbial activity, and these microbes perform nutrient cycling that supports food webs. The aim of the study was to identify microbial diversity and predict functional genetic potential of the microbial communities in the rhizosphere of black mangrove (*Avicennia germinans*), taking into account the salinity gradient. The location of soil samples was at the Brazo Riíto's mangrove, Ranchería river, La Guajira. The thesis is divided into three objectives: 1. Determinate microbial diversity present in the three sampling sites through gen 16S rRNA sequencing. 2. Evaluate the effect of physicochemical factors from soil into taxonomic diversity of microbial communities. 3. Predict functional potential microbial, by using PICRUSt software. Significant differences were found in 161 species along soil gradient salinity. Soil physicochemical variables such as organic carbon, clay and salinity affected the OTUs distribution. Through the PICRUSt prediction we identified significant differences genes such as *betA*, *betB*, *otsA*, *otsB*, *otsA* *otsB* y *proB* related to salinity stress tolerance. This work presents a vision of the microbial diversity present in the mangrove of La Guajira, the environmental variables that affect the diversity and the prediction of the metabolic functions that can be carrying out.

Keywords: 16S rRNA, microbial diversity, rhizosphere, mangrove, *Avicennia germinans*.

Contenido.

Pág.

Resumen.....	IX
Abstract.	X
Contenido.	XI
Lista de Figuras.....	XV
Lista de Tablas.	XVIII
Lista de Símbolos y Abreviaturas.....	XX
Símbolos con letras latinas.....	XX
Símbolos con letras griegas.	XX
Abreviaturas.....	XXI
Introducción.	1
1. Marco Conceptual.	5
1.1 Diversidad microbiana.	5
1.2 El suelo como hábitat microbiano.	6
1.3 El microbioma de la rizósfera.....	6
1.4 Los estuarios.	7
1.5 El ecosistema de los bosques de manglar y su importancia.	8
1.6 Comunidades bacterianas en suelos de manglar.....	9
1.7 Mecanismos de tolerancia salina en manglares y el papel de las Rizobacterias.	10
1.7.1 Tolerancia a estrés salino en bacterias.	10
1.7.2 Actividad ACC deaminasa en bacterias.	11
1.8 Nuevas tecnologías de secuenciación.	12
1.8.1 Secuenciación Illumina.	12
1.9 Análisis de datos en metagenómica.	13
1.10 Cobertura de datos metagenómicos.	13
1.11 Secuenciación del gen 16S rRNA.....	14
1.12 Análisis bioinformático de secuencias de ADN.	15
1.12.1 Herramientas para el análisis de secuencias de ADN.	15
1.12.2 Análisis de diversidad microbiana.	16
▪ Diversidad alfa.....	16

Curva de Rarefacción.....	16
Índice de Simpson.....	17
Índice de Shannon.....	17
Perfil de Entropía de Rényi.....	18
▪ Diversidad beta.....	18
Predicción funcional.....	19
2. Antecedentes.....	22
2.1. Diversidad microbiana en suelos de manglar.....	22
2.1.1. Análisis del microbioma mediante Metagenómica.....	22
2.1.2. Diversidad microbiana mediante la secuenciación del gen 16S rRNA... 23	
2.1.3. Diversidad de Archaeas en suelos de manglar.....	25
2.2. Potencial biotecnológico de los microorganismos de manglar.....	26
2.3. Estudio del potencial genético funcional microbiano en suelos de manglar. . 27	
2.4. Predicción funcional.....	27
3. Planteamiento del Problema.....	28
4. Justificación.....	30
5. Pregunta de investigación.....	32
5.1 Hipótesis.....	32
6. Objetivos.....	34
6.1 Objetivo general.....	34
6.2 Objetivos específicos.....	34
7. Metodología.....	36
7.1 Descripción del lugar de estudio.....	36
7.2 Diseño del muestreo.....	38
7.3 Análisis fisicoquímico de suelos.....	38
7.4 Determinación de la diversidad microbiana.....	39
7.4.1 Extracción de ADN.....	39
7.4.2 Amplificación y Secuenciación del gen 16S ADN ribosomal	39
7.5 Análisis Bioinformático.....	41
7.5.1 Ensamblaje de pares de secuencias crudas y primer filtro de calidad.....	41
7.5.2 Alineamiento de secuencias a base de datos SILVA.....	41
7.5.3 Análisis de la diversidad microbiana.....	42
7.5.4 Predicción funcional y visualización.....	42
7.6 Análisis Estadístico.....	43
8. Resultados y Discusión.....	46
8.1 Análisis fisicoquímico del suelo rizosférico.....	46
8.2 Análisis de Componentes Principales de los parámetros fisicoquímicos en muestras de suelo rizosférico.....	48
8.3 Extracción de ADN.....	50
8.4 Análisis de calidad de las secuencias.....	50
8.5 Análisis de diversidad de las comunidades microbianas.....	51
8.5.1 Curva de Rarefacción.....	52
8.5.2 Índices de Alfa-Diversidad.....	53
8.5.3 Perfiles de Entropía de Rényi.....	54

8.5.4	Índice de Beta-Diversidad.....	56
8.6	Correlación de las características fisicoquímicas de las muestras y estructura de las comunidades microbianas.	57
8.7	Estructura de la Comunidad de Bacterias y Archaeas.	59
8.7.1	Estructura de la comunidad de Bacterias: <i>Proteobacteria</i>	63
➤	Estructura de la comunidad de <i>Proteobacteria</i> a nivel de clase.	63
➤	Estructura de la comunidad de <i>Alfaproteobacteria</i> a nivel de orden.....	64
➤	Estructura de la comunidad de <i>Betaproteobacteria</i> a nivel de orden.....	65
➤	Estructura de la comunidad de <i>Gammaproteobacteria</i> a nivel de orden. ..	67
8.7.2	Estructura de la Comunidad de Archaeas: <i>Euryarchaeota</i> y <i>Crenarchaeota</i> . 68	
➤	Archaea en otros niveles taxonómicos.....	70
8.7.3	Comparación de la Composición Bacteriana a lo largo del Gradiente de Salinidad.	71
➤	<i>Phylums</i> bacterianos con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.	71
➤	Clases bacterianas con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.	72
➤	Órdenes bacterianos con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.	73
➤	Familias bacterianas con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.	74
➤	Géneros bacterianos con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.	75
➤	Especies bacterianas con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.	77
8.7.4	Análisis de la Abundancia Diferencial de OTUs al nivel de mayor resolución taxonómica posible.....	79
8.7.5	Bacterias halotolerantes.	84
8.8	Predicción funcional de las comunidades microbianas presentes en suelos de manglar.....	85
8.8.1	Análisis de Componentes Principales de los genes predichos.....	85
8.8.2	Predicción de funciones metabólicas.....	86
8.8.3	Predicción de genes involucrados en mitigación de estrés por salinidad. .	89
9.	Conclusiones y Recomendaciones.....	95
9.1	Conclusiones.....	95
9.2	Recomendaciones.....	96
A.	Anexo A: Protocolo para la extracción de ADN a partir de suelo (Kit comercial).....	98
B.	Anexo B: Comparaciones de abundancias relativas a nivel de <i>Phylum</i> con otros trabajos.....	100
C.	Anexo C: Grupos taxonómicos con diferencias significativas entre los niveles de salinidad, valores de <i>p</i> y número de secuencias.....	101
	Bibliografía	117

Lista de Figuras.

	Pág.
Figura 1-1: Árbol filogenético. Todos los organismos complejos provienen a partir de un solo ancestro común unicelular. Fuente: Lodish <i>et al.</i> , 2010.	6
Figura 1-2: Vista transversal de un estuario. Fuente: Day <i>et al.</i> , 2012.	8
Figura 1-3: Amplificación clonal de secuencias en la metodología Illumina. Fuente: Shendure & Ji, 2008 (modificada).	13
Figura 1-4: Comparación de la cobertura de secuenciación en diferentes ambientes con distinta diversidad microbiana. Fuente: Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014b.	14
Figura 7-1: Localización de los puntos de muestreo en la desembocadura del río Ranchería, brazo Riíto, coordenadas presentadas en formato Magna Sirgas. Fuente: ArcGIS v. 10.4.	36
Figura 7-2: Fotografía manglar. Delta del río Ranchería (brazo Riíto), La Guajira, Colombia. Fuente: Tomada por Ingrid Paola Figueroa Galvis, 2015.	37
Figura 7-3: Cobertura de <i>primers</i> V3F y V4R en el gen 16S ADN ribosomal de <i>E. coli</i> y tamaño del amplicón generado. Fuente: Cai <i>et al.</i> , 2013 (con modificaciones).	40
Figura 7-4: Esquema que resume el análisis bioinformático llevado a cabo en la metodología (flujo de trabajo).....	44
Figura 8-1: PCA de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo rizosférico. Las réplicas tomadas de la zona de salinidad baja se denominaron 1A, 1B y 1C, réplicas de zona de salinidad media 2A, 2B y 2C; y réplicas de zona de salinidad alta 3A, 3B y 3C.	49
Figura 8-2: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con <i>Sybr Safe</i> del ADN total extraído a partir de suelo rizosférico.	50
Figura 8-3: Valores de medias de los puntajes de calidad de las secuencias crudas a lo largo de la longitud de las mismas, calculados con el programa MultiQC v. 0.8.....	51
Figura 8-4: Curvas de rarefacción del número de OTUs con un 97% de similaridad en las réplicas de muestreo. 1A, 1B y 1C: réplicas en zona de baja salinidad; 2A, 2B y 2C: réplicas en zona de salinidad media; 3A, 3B y 3C: réplicas en zona de salinidad alta.	53
Figura 8-5: Perfiles de diversidad de Rényi para cada réplica de muestreo.	55

Figura 8-6: Análisis del agrupamiento del perfil de OTUs de acuerdo a las distancias de Bray Curtis.	56
Figura 8-7: Análisis de correspondencia canónica (CCA) ilustrando las relaciones entre la estructura de OTUS (cruces rojas) y las variables ambientales CO, arcilla y salinidad. ...	57
Figura 8-8: Abundancias relativas a nivel de <i>Phylum</i> (filo) de las taxas más abundantes de Bacterias y Archaeas en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).	60
Figura 8-9: Abundancias relativas a nivel de clase dentro del filo <i>Proteobacteria</i> en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).	63
Figura 8-10: Abundancias relativas a nivel de orden dentro de la clase <i>Alphaproteobacteria</i> en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).	64
Figura 8-11: Abundancias relativas a nivel de orden dentro de la clase <i>Betaproteobacteria</i> en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).	66
Figura 8-12: Abundancias relativas a nivel de orden dentro de la clase <i>Gammaproteobacteria</i> en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).	67
Figura 8-13: Abundancias relativas a nivel de <i>phylum</i> en archaea en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).	69
Figura 8-14: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de los filos que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).	71
Figura 8-15: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de los grupos microbianos a nivel de clase que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).	73
Figura 8-16: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de los grupos microbianos a nivel de orden que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).	74
Figura 8-17: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de las familias que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).	75
Figura 8-18: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de los géneros que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).	76
Figura 8-19: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de las especies que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).	78

Figura 8-20: Mapa de calor y agrupamiento jerárquico de conteos transformados para los 40 OTUs con la varianza general más grande. En la parte superior de la gráfica, salinidad alta: violeta; salinidad media: verde; salinidad baja: naranja. 80

Figura 8-21: PCA de los genes predichos mediante el software PICRUSt v.1.0.0 a partir de información del gen 16S, visualización mediante software STAMP v.2.1.3. Salinidad baja (naranja), salinidad media (azul) y salinidad alta (verde). 85

Figura 8-22: Predicción PICRUSt del perfil funcional de las comunidades microbianas basado en secuencias del gen 16S rRNA. Gráficas de barras de error extendidas indicando diferencias en el perfil funcional a los niveles de salinidad baja (1) y salinidad media (2). Todas las lecturas no clasificadas fueron removidas. Las categorías fueron seleccionadas por el valor p calculado usando t-test Welch's *two-sided*. 86

Figura 8-23: Predicción PICRUSt del perfil funcional de las comunidades microbianas basado en secuencias del gen 16S rRNA. Gráficas de barras de error extendidas indicando diferencias en el perfil funcional a los niveles de salinidad media (2) y salinidad alta (3). Todas las lecturas no clasificadas fueron removidas. Las categorías fueron seleccionadas por el valor p calculado usando t-test Welch's *two-sided*. 87

Figura 8-24: Predicción PICRUSt del perfil funcional de las comunidades microbianas basado en secuencias del gen 16S rRNA. Gráficas de barras de error extendidas indicando diferencias en el perfil funcional a los niveles de salinidad baja (1) y salinidad alta (3). Todas las lecturas no clasificadas fueron removidas. Las categorías fueron seleccionadas por el valor p calculado usando t-test Welch's *two-sided*. 88

Figura 8-25: PCA de los genes predichos relacionados a tolerancia a salinidad, a lo largo del gradiente de salinidad. 94

Lista de Tablas.

	Pág.
Tabla 7-1: Características de las zonas de muestreo.	37
Tabla 8-1: Valores promedios y error estándar (en paréntesis) de los parámetros físicoquímicos en las tres zonas de muestreo de suelo rizosférico de <i>A. germinans</i>	46
Tabla 8-2: Valores promedio de riqueza y diversidad microbianas para cada zona de muestreo.	54
Tabla 8-3: Distribución de OTUs en filos de archaea.	68
Tabla 8-4: Valores promedios de lecturas asignadas a categorías taxonómicas de archaea, en los diferentes niveles de salinidad.	70
Tabla 8-5: Grupos microbianos encontrados en diferentes categorías taxonómicas de archaea en todos los niveles de salinidad. En paréntesis el número de lecturas totales asignadas a cada categoría.	70
Tabla 8-6: Valores promedio de OTUs clasificados en grupos bacterianos halotolerantes.	84
Tabla 8-7: Selección de genes involucrados en tolerancia a estrés por salinidad y número promedio de genes predichos por PICRUSt.	92
Tabla Anexo B-1: Comparación de las abundancias relativas de los principales grupos microbianos más abundantes a nivel de <i>Phylum</i>	100
Tabla Anexo C-1: Grupos taxonómicos a nivel de <i>phylum</i> con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).	101
Tabla Anexo C-2: Grupos taxonómicos a nivel de clase con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).	102
Tabla Anexo C-3: Grupos taxonómicos a nivel de orden con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).	104

Tabla Anexo C-4: Grupos taxonómicos a nivel de familia con diferencias significativas entre los niveles de salinidad, valores de ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C)..... 107

Tabla Anexo C-5: Grupos taxonómicos a nivel de género con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C)..... 109

Tabla Anexo C-6: Grupos taxonómicos a nivel de especie con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C)..... 113

Lista de Símbolos y Abreviaturas.

Símbolos con letras latinas.

Símbolo	Término
$1/D$	Índice de la diversidad Inversa de Simpson.
g	Unidad de aceleración para expresar la fuerza centrífuga relativa de las centrífugas.
mm	Milímetros.
p	Abundancia relativa de especies.

Símbolos con letras griegas.

Símbolo	Término
α	Parámetro de escalas de entropía Rényi.
μg	Microgramos.
μl	Microlitros.

Abreviaturas.

Abreviatura	Término
ACC	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa.
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés: <i>desoxyribonucleic acid</i> .
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, del inglés: <i>United States Enviromental Protection Agency</i> .
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
KEGG	Recurso bioinformático para la unión de genomas a la vida y el ambiente, por sus siglas: Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas. Del inglés: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> .
KO	Base de datos de funciones a nivel molecular, por sus siglas: Ortología KEGG. Del inglés: <i>KEGG Orthology</i> .
NGS	Secuenciación de próxima generación, del inglés: <i>next-generation sequencing</i>).
OTU	Unidad taxonómica operativa, del inglés: operational taxonomic unit.
pb	Pares de bases de DNA.
PCA	Análisis de componentes principales, del inglés: <i>principal component analysis</i> .
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés: <i>polymerase chain reaction</i> .
PICRUST	Investigación filogenética de comunidades por reconstrucción de estados no observados, del inglés: <i>Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States</i> .
PGPB	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés: <i>ribonucleic acid</i> .
rRNA	RNA ribosomal.
SILVA	Recurso web y de base de datos de secuencias ribosomales alineadas de Bacteria, Archaea y Eukaryota, del latín: <i>silva</i> .
ppt	Partes por mil.
Tº	Temperatura.

Introducción.

Los ecosistemas de manglar son bosques pantanosos costeros que se encuentran en las zonas intermareales y se caracterizan por tener árboles halófilos, adaptados a vivir en ambientes con gradientes de salinidad y con fluctuaciones en el régimen de mareas que generan cambios de la condición aerobia a anaerobia. Los bosques de manglar constituyen una importante fracción de las zonas costeras mundiales, representando entre el 60 y 70%, además, su importancia radica en los diversos servicios ecosistémicos que prestan los manglares (FAO, 2007).

Los manglares proporcionan beneficios ecológicos que sostienen diferentes actividades económicas, como la protección a inundaciones y huracanes, reducción de la erosión de la línea costera, mantenimiento de la diversidad, regulación climática, y también evita la eutrofización del cuerpo lagunar y de las zonas marinas adyacentes (Lavieren *et al.*, 2012). Los sedimentos en los manglares son lugares con alto contenido de materia orgánica pero son escasos en nutrientes como nitrógeno y fósforo, por lo tanto, la limitación de estos nutrientes inhibe la degradación de la materia orgánica llevada a cabo por los microorganismos (Feller *et al.*, 2002; Lavieren *et al.*, 2012; Alongi, 2014; Weiss *et al.*, 2016). Una gran parte del nitrógeno que ingresa a los ecosistemas de manglar se debe a la fijación biológica de nitrógeno realizada por los microorganismos (Bashan & Holguin, 2002; Reef *et al.*, 2010). Por otro lado, la diversidad microbiana en los sedimentos transforma continuamente la necromasa en compuestos de nitrógeno y fósforo que pueden ser aprovechables por las plantas. A su vez, las plantas exudan a nivel radicular fuentes alimenticias (ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos, moléculas de señalización, entre otros) para mantener los organismos en el ecosistema. Por lo tanto, la interrupción parcial de la actividad microbiana tendría un impacto negativo sobre la productividad de mangle y podría conducir a una pérdida severa de la producción pesquera y de camarón en aguas costeras (Holguin *et al.*, 2001).

Numerosos estudios acerca del potencial biotecnológico de las comunidades microbianas presentes en ecosistemas de manglar muestran un panorama importante sobre la aplicación de ciertos microorganismos a nivel industrial, existiendo algunos casos exitosos, por ejemplo la producción de biopesticidas, producción de proteínas como la proteasa extracelular alcalina a partir de *Vibrio fluvialis* y a nivel farmacéutico, la producción de componentes antimicrobianos como el Enniating G de *Fusarium sp* (Venugopal & Saramma, 2006; Cheng *et al.*, 2009; Thatoi *et al.*, 2012). Por consiguiente, los microorganismos presentes en los suelos de manglar, sus posibles interacciones y actividades metabólicas se convierten en un tema de gran interés teniendo en cuenta que es un ecosistema que ha sido poco estudiado, especialmente tratándose de los manglares colombianos.

Por lo tanto, este trabajo tiene como propósito presentar información sobre la diversidad de bacterias y archaeas que se encuentran en el suelo del manglar colombiano ubicado en la desembocadura del Río Ranchería, así como observar el potencial funcional de esas comunidades microbianas mediante la predicción del metagenoma *in silico*. De esta manera, se obtiene un mejor entendimiento sobre la información taxonómica y metabólica de los microorganismos que se establecen en la rizósfera del mangle *A. germinans*; asimismo, sobre cómo las características fisicoquímicas del suelo y especialmente la salinidad afectan a la comunidad microbiana.

1. Marco Conceptual.

1.1 Diversidad microbiana.

La biodiversidad en el planeta tierra está conformada por tres dominios de la vida. Todas las células de los organismos vivos pertenecen ya sea a Bacteria, Archaea y Eukarya; además, estos dominios surgieron por la divergencia a partir de un antecesor común, llamado "ancestro universal". Bacteria y archaea presentan una zona de concentración de ADN genómico denominado nucleóide no rodeado por una membrana y por tanto se denominan procariotas, a diferencia de eukarya, que presenta un núcleo rodeado por una membrana o 'núcleo verdadero' por lo que se denominan eucariotas (Madigan *et al.*, 2004).

El árbol filogenético que se observa en la figura 1-1 fue desarrollado por investigadores que asumieron que los organismos con más genes similares, están más estrechamente relacionados entre sí por un ancestro común que aquellos organismos con mayor diferencia en sus genes. Esta figura muestra entonces, que los organismos de archaeas y eukaryotas divergieron a partir de las eubacterias, antes de que archaeas y eukaryotas divergieran entre ellas. Muchas archaeas crecen en ambientes extremos que pueden asemejarse a estados iniciales de la historia de la vida en el planeta tierra, siendo algunas halófilas, termoacidófilas, etc. (Lodish *et al.*, 2010).

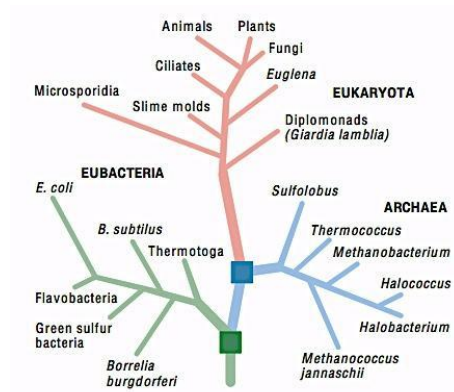


Figura 1-1: Árbol filogenético. Todos los organismos complejos provienen a partir de un solo ancestro común unicelular. Fuente: Lodish *et al.*, 2010.

1.2 El suelo como hábitat microbiano.

Daniel (2005) describe de la siguiente manera el suelo como hábitat de los microorganismos:

“El suelo es tal vez uno de los ambientes de más difícil estudio para los microbiólogos debido al tamaño de la comunidad microbiana allí presente [:] pero también por la basta diversidad que puede encontrarse (...) Esta diversidad microbiana se debe principalmente a la variación en las características fisicoquímicas del suelo [:] que forman distintos nichos.”

Asimismo, los microorganismos contribuyen a la modificación de las características fisicoquímicas del suelo, por medio del ciclaje de nutrientes y otras interacciones, permitiendo su sostenibilidad en el medio (Prosser, 2015).

1.3 El microbioma de la rizósfera.

La rizósfera ha sido definida como la estrecha zona del suelo que es influenciada por las secreciones radiculares de la planta, que puede contener hasta 10^{11} células microbianas por gramo de raíz (Berendsen *et al.*, 2012). Por lo tanto, se reconoce a la rizósfera como un *hot spot* o punto caliente de las actividades microbianas causado por el aumento de

nutrientes liberados por las raíces de las plantas (Egamberdieva *et al.*, 2008). Los organismos que se encuentran en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, oomycetes, nemátodos, protozoos, algas, virus, arqueas y artrópodos (Raaijmakers *et al.*, 2009). Se ha determinado que los hongos y las bacterias se encuentran en una mayor abundancia en la rizósfera en comparación al suelo no rizosférico (Morgan *et al.*, 2005). Entre los organismos de la rizósfera que han sido mayormente estudiados, debido a sus efectos en el crecimiento vegetal, se encuentran las bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos formadores de micorriza, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), microorganismos biocontroladores, hongos micoparásitos y protozoos (Mendes *et al.*, 2013).

Una conocida asociación mutualista entre hongos y raíces vegetales es la simbiosis micorrícica; por un lado, en esta asociación el hongo puede proveer a la planta acceso a agua y nutrientes, dado a que se extiende el área para su adquisición a través de la red de hifas extra-radicales, y por otro lado, la planta provee de carbohidratos al hongo micorriza para su crecimiento (Smith & Read, 1997).

1.4 Los estuarios.

Una de las definiciones más aceptadas para el término estuario es la dada por Pritchard como "un cuerpo de agua costero semicerrado que tiene una conexión libre con el mar abierto en el que el agua de mar se diluye con el agua dulce procedente del drenaje del terreno" (Day *et al.*, 2012). El drenaje del agua dulce al que se refiere la anterior definición puede atribuirse a la desembocadura de un río en una zona costera.

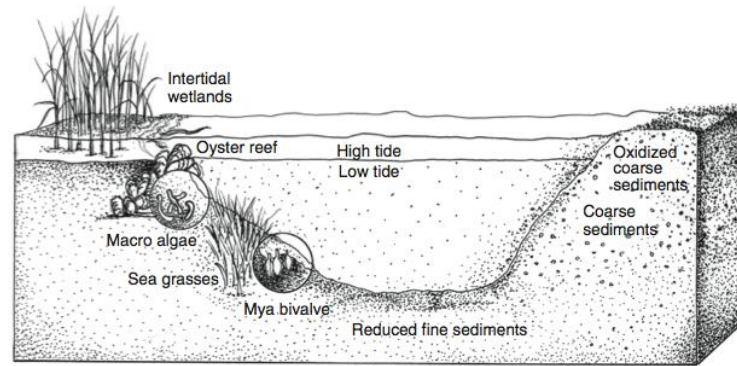


Figura 1-2: Vista transversal de un estuario. Fuente: Day *et al.*, 2012.

Los estuarios están constituidos por diferentes tipos de hábitats como por ejemplo zonas de bahías, lagunas, deltas, así como zonas intermareales profundas y poco profundas. Las zonas intermareales poco profundas de los estuarios corresponden en su mayoría a hábitats de manglar (Day *et al.*, 2012). En la figura 1-2 se puede observar los diferentes tipos de hábitats que se encuentran en un estuario.

1.5 El ecosistema de los bosques de manglar y su importancia.

Los bosques de manglar son pantanos costeros que se encuentran en las áreas poco profundas de los estuarios de regiones tropicales y subtropicales. Estos ecosistemas se caracterizan por tener árboles halófilos, arbustos y otras plantas que crecen en aguas marinas con diferentes gradientes de salinidad (EPA, 2012). Los bosques de manglares se encuentran en 123 países y territorios a nivel mundial, y cubren un total de 152.000 km²; por lo tanto, esto los convierte en un tipo de bosque relativamente poco frecuente a nivel global. Las expansiones más grandes de bosque de manglar incluyen Los Sundarbans, el Delta del Níger en Nigeria y el complejo de costas deltaicas del norte de Brasil y sur de Papúa; estas áreas juntas suman el 16,5% de los manglares del mundo (Spalding *et al.*, 2010).

La importancia que presentan los ecosistemas de bosques de manglar se debe a los diversos servicios ecosistémicos que estos llevan a cabo. Los manglares son lugares de conservación de la diversidad biológica, proporcionando hábitats, zonas de cría y provisión de nutrientes para un gran número de especies de animales. Estos animales

incluyen varias especies en peligro de extinción, como por ejemplo, reptiles (cocodrilos, iguanas y serpientes), anfibios, mamíferos (tigres, ciervos, nutrias, manatíes y delfines), aves (garzas, garcetas, pelícanos y águilas) entre otros. Asimismo, una amplia gama de pescados y mariscos de interés comercial y no comercial dependen de estos bosques costeros. Los manglares también tienen una función clave en la prevención y la reducción de la erosión costera y ofrece a las comunidades cercanas protección contra los efectos del viento, las olas y las corrientes del agua. Los manglares son explotados por pescadores, agricultores y otras poblaciones rurales que los utilizan como fuente de alimentación, para extraer madera, y en la producción de taninos (FAO, 2007).

1.6 Comunidades bacterianas en suelos de manglar.

En los estuarios costeros las bacterias se encuentra de manera abundante; los sedimentos y suelos salinos albergan más bacterias por unidad de volumen que en la columna de agua. Los microorganismos son importantes para la función y estructura de los ecosistemas de manglar a través de diferentes actividades que realizan como el ciclaje de nutrientes, descomposición de la materia orgánica y la conversión de detritos a partir de compuestos de difícil asimilación a compuestos aprovechables por otros consumidores en la cadena alimenticia (Day *et al.*, 2012).

Los ecosistemas de manglar son ricos en materia orgánica pero tienen bajos niveles de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Weiss *et al.*, 2016). La alta productividad de este ecosistema se explica por un mecanismo de eficiencia en el reciclaje de nutrientes, en el cual las comunidades microbianas presentes en los sedimentos juegan un papel primordial (Holguín *et al.*, 2001). Los microorganismos continuamente transforman la necromasa en fuentes de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes asimilables por las plantas, asimismo, las plantas liberan diferentes exudados radiculares como ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos entre otros, que mantienen las comunidades microbianas activas en la rizósfera de plantas del mangle (Nogueira *et al.*, 2015; Reef *et al.*, 2010).

Por lo tanto, los ecosistemas de manglar dependen de las bacterias para el reciclaje de nutriente, asimismo, las bacterias se ven beneficiadas de los exudados radiculares

(Holguin *et al.*, 2001). Se conocen a las bacterias como los mayores contribuidores del flujo de carbono en los sedimentos (Holguin *et al.*, 1999); además, se sabe de su papel clave en el ciclo del nitrógeno en todas las transformaciones, desde la fijación, amonificación, nitrificación y denitrificación (Abraham *et al.*, 2004).

1.7 Mecanismos de tolerancia salina en manglares y el papel de las Rizobacterias.

Los mangles son plantas halófilas tolerantes facultativas, las cuales tienen un óptimo crecimiento en diversos rangos de salinidad dependiendo de la especie de mangle de la que se trate (Parida & Jha, 2010). Algunos de los mecanismos fisiológicos de tolerancia a la salinidad en éstas plantas son la regulación de absorción de sales y exclusión, tales como ultrafiltración, secreción salina y secuestro de iones; incluso se ha reportado que especies de mangle pueden acumular iones de sales como osmolitos para balancear el potencial osmótico de sus membranas (Liang *et al.*, 2008).

Adicionalmente, estudios han demostrado el papel promisorio de las denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) para aliviar el estrés en plantas causado por suelos salinos (Yao *et al.*, 2010). Los mecanismos encontrados que son utilizados por las PGPB para mitigar el estrés salino son diversos, por ejemplo, facilitando la absorción de nutrientes a través de la producción de fitohormonas o por la inhibición enzimática de los niveles de etileno en la planta, y la producción de sideróforos (Shrivastava & Kumar, 2015).

1.7.1 Tolerancia a estrés salino en bacterias.

El estudio de microorganismos capaces de crecer en ambientes salinos, ha arrojado información acerca de sus mecanismos de adaptación, de lo cual se ha encontrado que utilizan principalmente dos estrategias para mantener el balance osmótico entre el citoplasma y el medio circundante: (a) la estrategia de aumento de sales del citoplasma y (b) la estrategia de solutos compatibles. La primera estrategia, como su nombre lo indica,

se caracteriza por el aumento de concentraciones molares de KCl dentro de la célula provocando cambios importantes en la maquinaria enzimática, incluyendo la sobre-representación de aminoácidos altamente ácidos como el aspartato; además, sólo se sabe de algunos microorganismos que pueden llevar a cabo éste mecanismo, tales como *Salinibacter ruber* y *Halobacterium sp* (Oren, 2008). La segunda estrategia consiste en el uso de solutos compatibles u osmoprotectores que no interfieren con el metabolismo de la célula, además se sabe que ésta estrategia es llevada a cabo por una amplia gama de microorganismos (Mirete *et al.*, 2015).

Los solutos compatibles son compuestos de bajo peso molecular, osmóticamente activos, azúcares altamente solubles en agua o alcoholes, lo cual hace a las bacterias halófilas versátiles en su adaptación a la salinidad (Das *et al.*, 2015). Los solutos compatibles comúnmente encontrados en bacterias son la ectoína y su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína; sin embargo, existen otros compuestos que realizan una función similar como el manitol, glicina-betaina, trehalosa, fructan y la prolina (Ofer *et al.*, 212).

1.7.2 Actividad ACC deaminasa en bacterias.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal usan diversos mecanismos para promover este crecimiento aún en condiciones estresantes para la planta, como por ejemplo en suelos salinos; sin embargo, se considera que la característica bacteriana clave en facilitar el crecimiento vegetal es poseer la actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa. La enzima ACC deaminasa rompe la molécula de ACC, el cual es un precursor inmediato del etileno, y se generan como resultado alfa-cetobutirato y amonio. Por lo tanto, ocurre la disminución del nivel de la hormona etileno en la planta, lo que se traduce en crecimiento de tallos y raíces, ya que cuando el etileno está presente en altas concentraciones puede causar la inhibición del crecimiento vegetal o incluso la muerte (Honma & Shimomura 1978; Glick, 2014).

1.8 Nuevas tecnologías de secuenciación.

Fred Sanger *et al.* (1977) desarrolló el primer método de secuenciación y por casi tres décadas fue la tecnología dominante en el mercado. El método de secuenciación Sanger es considerado una tecnología de 'primera generación', y debido a las limitaciones que presentó por una mayor demanda de secuenciación hubo la necesidad de crear nuevas y mejores tecnologías basadas en una mayor cantidad de ADN a secuenciar en un menor tiempo. Las nuevas metodologías son llamadas tecnologías de secuenciación de próxima generación o NGS (por sus siglas en inglés, *next-generation sequencing*) (Metzker, 2010).

Las tecnologías NGS se clasifican en dos principales categorías, el primer grupo son las tecnologías basadas en PCR donde se incluyen las plataformas Roche 454 Genomes Sequencer, (Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, USA), HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), AB SOLiD System (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) y Ion Personal Genome Machine (Life Technologies, South San Francisco, CA, USA). El segundo grupo de tecnologías no basadas en PCR son HeliScope (Helicos BioSciences Corp., Cambridge, MA, USA) y PacBio RS SMRT system (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) (Shokralla *et al.*, 2012).

1.8.1 Secuenciación Illumina.

La tecnología Illumina fue desarrollada inicialmente por Solexa (2007) y posteriormente adquirida por Illumina, Inc. Esta plataforma emplea una secuenciación por síntesis acoplada a una 'PCR en puente' que ocurre en una celda de flujo, los pasos generales de la preparación de la librería son fragmentación del ADN de alto peso molecular y su ligación a ADN sintético universal (adaptadores). La superficie de la celda posee oligos unidos a ella covalentemente, los cuales son complementarios a la secuencia de adaptadores que se ligan a los fragmentos de ADN de la muestra. Los adaptadores permiten diferenciar si se trata de una muestra u otra o si se trata de la secuencia *forward* o *reverse*. Posteriormente ocurre la amplificación en puente, en la cual se generan millones de *clusters* de fragmentos de la librería. En el siguiente paso, que corresponde a la secuenciación, una enzima ADN polimerasa modificada une nucleótidos marcados

fluorescentemente a la secuencia de ADN template, así cada señal de fluorescencia corresponde a un nucleótido incorporado en cada *cluster* (Shokralla *et al.*, 2012).

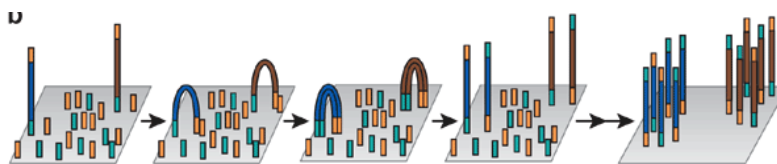


Figura 1-3: Amplificación clonal de secuencias en la metodología Illumina. Fuente: Shendure & Ji, 2008 (modificada).

En general, ninguna tecnología de secuenciación es mejor que otra, sino que se trata de escoger la tecnología que mejor se adapte al objetivo deseado. Algunas metodologías de secuenciación son más eficientes para proyecto donde se estén estudiando amplicones y otras presentan mejores rendimientos para secuenciación de mayor información como genomas completos o metagenomas.

1.9 Análisis de datos en metagenómica.

Un metagenoma corresponde a la colección de genomas de una comunidad microbiana dada, lo cual es posible hacerse hoy en día con mayor facilidad debido al menor costo de las nuevas tecnologías de secuenciación, por lo tanto, el análisis de esos datos se ha convertido en un reto mayor (Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014a). Al obtener una gran cantidad de secuencias de ADN, los estudios en metagenómica buscan responder tres preguntas principales: ¿quién está presente en ese ecosistema muestreado?, ¿qué están haciendo allí?, lo cual se refiere a la función, y ¿cómo están interactuando las diferentes comunidades en ese nicho específico? (Oulas *et al.*, 2015).

1.10 Cobertura de datos metagenómicos.

La metagenómica supone teóricamente una representación de los genomas de una comunidad microbiana presente en un ambiente dado. Esta fracción del metagenoma que se estudia se denomina “cobertura”, y tiene una gran importancia en relación a los

resultados que puedan obtenerse a partir del poder del análisis estadístico, análisis de la diversidad y comparación entre ambientes (Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014a).

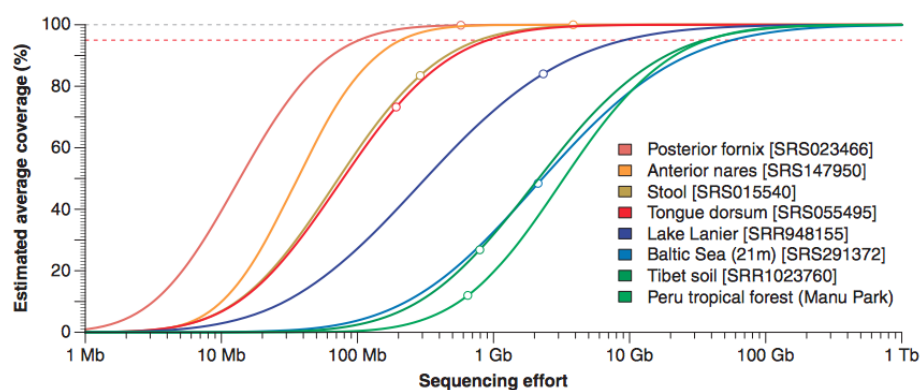


Figura 1-4: Comparación de la cobertura de secuenciación en diferentes ambientes con distinta diversidad microbiana. Fuente: Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014b.

Rodríguez-R y Konstantinidis (2014b) propusieron un método denominado "Nonpareil" con el fin de determinar el esfuerzo de secuenciación requerido para abarcar la diversidad total de la comunidad microbiana presente en diferentes ambientes. En la figura 1-4 se aprecia el porcentaje de la cobertura de secuenciación promedio lograda de acuerdo a distintos esfuerzos de secuenciación y cómo la cantidad de información requerida depende de la naturaleza del medio ambiente que se requiere estudiar. La diversidad en muestras de lago, mar y suelo requirieron un mayor esfuerzo de secuenciación que la diversidad presente en muestras a partir del cuerpo humano (Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014b).

1.11 Secuenciación del gen 16S rRNA.

La secuenciación de genes marcadores como el gen 16S del RNA ribosomal permite determinar la composición taxonómica de comunidades microbianas complejas, siendo dicha complejidad dependiente de la naturaleza del ecosistema (Lane *et al.*, 1985). En comparación a la secuenciación del metagenoma completo, la secuenciación del gen 16S ofrece la ventaja de ser relativamente menos costosa y más rápida, produciendo secuencias de una sola región del genoma que pueden ser alineadas a secuencias de

bases de datos; asimismo, existen flujos de trabajo estandarizados para el análisis de este tipo de datos (Sanschagrín & Yergeau, 2014).

1.12 Análisis bioinformático de secuencias de ADN.

Los datos de secuencias obtenidos a partir de secuenciación son frecuentemente llamados “datos crudos” que deben tener un pre-procesamiento con el fin de obtener datos con mejor calidad para los siguientes análisis (Bik *et al.*, 2012):

- *Denoising*: Eliminación de secuencias ruido.
- *Filtering*: Eliminación de secuencias de baja calidad.
- *Trimming*: Corte de los extremos de secuencias con baja calidad.
- *Chimeras*: Eliminación de lecturas quiméricas.
- *Aggregating*: Combinación de lecturas similares o taxa similar.

El análisis filogenético molecular según Pevsner (2015) se divide en cinco pasos principales:

Selección de las secuencias para el análisis, (2) alineamiento múltiple de secuencias (...) homólogas de ácidos nucleicos, (3) especificación de un modelo estadístico de la evolución de nucleótidos (...), (4) construcción del árbol, y (5) evaluación del árbol.

1.12.1 Herramientas para el análisis de secuencias de ADN.

Entre las plataformas utilizadas para el análisis de secuencias del gen 16S rRNA están el software MOTHUR y QIIME. La plataforma MOTHUR fue desarrollada por Schloss *et al.* (2009) cuyo objetivo fue obtener un paquete de software completo para realizar diferentes operaciones necesarias para el análisis del ADN de una comunidad microbiana, tales herramientas incluyen el corte y alineamiento de secuencias, cálculo de métricas como alfa y beta-diversidad (Kuczynski *et al.*, 2012; Schloss *et al.*, 2009).

En general estas plataformas de análisis de secuencias de genes marcadores siguen un conjunto de funciones como las siguientes (Pepper *et al.*, 2014):

(1) Conversión de secuencias crudas a formato FASTA, (2) filtrado de calidad de las secuencias, (3) separación del pool de secuencias en sus muestras originales en base al *barcode tag*, (4) reducción de datos que permita la eficiencia computacional, (5) detección de potenciales lecturas quiméricas. (...) Otras plataformas también (1) intentan minimizar ruido como resultado de secuencias ruidosas, (2) agrupamiento de secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) o en bases similares, (3) asignación de identidades a cada secuencia a través de bases de datos de referencia y (4) análisis adicionales como índices de diversidad, evaluación de similitudes y diferencias de una muestra a otra y detección de características que identifican una comunidad de otra.

1.12.2 Análisis de diversidad microbiana.

- **Diversidad alfa.**

La diversidad alfa se define como la diversidad microbiana de especies presentes dentro de una comunidad o ambiente (Nemergut *et al.*, 2013). Los métodos para el estudio de la diversidad alfa, se han dividido en los dos siguientes grandes grupos: (1) Métodos basados en la cuantificación del número de especies presentes o riqueza específica y (2) métodos basados en la estructura de la comunidad o en la distribución proporcional del valor de importancia de cada especie. Dentro de los métodos de riqueza se encuentra el análisis de rarefacción de la comunidad. Por otro lado, los métodos basados en la estructura de la comunidad se clasifican en los modelos paramétricos, modelos no paramétricos y los índices de abundancia proporcional, siendo este último clasificado en índices de dominancia (por ejemplo, índice de Simpson) e índices de equidad (por ejemplo, índice de Shannon) (Moreno, 2001).

Curva de Rarefacción.

La curva de rarefacción de una comunidad microbiana es la representación gráfica del número de especies observadas como una función de cada muestra analizada. La baja estimación de las especies es obtenida asumiendo que las especies no observadas son aproximadamente tan raras como las especies más raras observadas. La sobre

estimación es obtenida asumiendo que las especies no observadas están representadas en la comunidad observada por individuos únicos.

$$S_m = \sum F_k \left(1 - \frac{\left(\frac{M - M_i}{m} \right)}{\frac{M}{m}} \right)$$

La ecuación de la curva de rarefacción, donde:

S_m = número de especies esperado

F_k = número de especies muestreado en k tiempos

M = Número total de individuos o tamaño de la muestra

M_i = Número de individuos de la i ésima especie de la muestra

m = tamaño de la muestra estandarizado

Índice de Simpson.

El índice de Simpson hace parte de los índices de dominancia dentro de los métodos basados en la estructura de la comunidad. Los índices de dominancia son parámetros inversos al concepto de uniformidad o equidad de la comunidad; por lo tanto, el índice de Simpson manifiesta la probabilidad que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie, lo cual está fuertemente influenciado por la importancia de las especies más dominantes (Simpson, 1949).

$$\lambda = \sum p_i^2 \quad \text{donde, } p_i \text{ es la abundancia proporcional de la especie } i$$

Como su valor es el inverso de la equidad, la diversidad puede calcularse como $1 - \lambda$. El Índice de Diversidad Inversa de Simpson ($1/D$) permite identificar de esta manera la complejidad de las comunidades.

Índice de Shannon.

El índice de Shannon indica la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Este índice estima el grado promedio de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección. Este

índice parte de la presunción que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra (Magurran, 2013).

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \quad \text{donde, } p_i \text{ es la abundancia proporcional de la especie } i$$

Perfil de Entropía de Rényi.

Los perfiles de entropía de Rényi son una medida informativa extrapolada de Shannon, en momentos de la misma función en una escala de parámetros ($\alpha = 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; \text{infinito}$), lo cual refleja la partición de las abundancias entre especies, constituyendo una buena representación de una continuidad en las medidas de diversidad posibles (Bonilla-Rosso *et al.*, 2012). La fórmula de la entropía de Rényi es como sigue, donde:

$$H_\alpha = \frac{\ln(\sum_{i=1}^S p_i^\alpha)}{1-\alpha}$$

H_α = N° de especies que podrían estar en una misma medida de entropía.

p_i = abundancia relativa de i especies.

α = parámetro de escala.

▪ Diversidad beta.

La diversidad beta puede definirse como la variación en la composición de las especies entre diferentes sitios de un área geográfica o entre muestras es decir, el grado de movilidad de las especies entre un hábitat y otro o entre una comunidad y otra (Legendre *et al.*, 2005). La diversidad beta se puede obtener calculando el cociente entre el número de especies distintas y el número de especies total considerando el conjunto de dos comunidades.

AQUÍ QUEDÉ BIBLIOGRAFÍA

Para medir la diversidad beta se implementan índices de similitud/disimilitud como el índice Bray-Curtis, métodos cualitativos como el de Sorensen y el de Jaccard, cuantitativos como el de Morisita-Horn y de recambio de especies como los de Whittaker,

Cody y Magurran (Villareal *et al.*, 2006), siendo el de Bray-Curtis el más utilizado. En el índice de Bray-Curtis se implementa la distancia entre comunidades considerando la presencia/ausencia, además de la abundancia de las especies y otras características como la cobertura y la biomasa. El índice de Sorensen tiene en cuenta solamente la presencia/ausencia. En este último el valor tenderá a ser 0 cuando no existan especies comunes y a 1 cuando ambas comunidades sean idénticas en su composición (Ferriol *et al.*, 2012).

Predicción funcional.

Las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento permiten obtener de forma rápida y más económica las secuencias de ADN tanto de genes marcadores, así como tener una amplia mirada de un metagenoma. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de las muestras de estudio, se requiere suficiente profundidad de secuenciación para poder obtener información de organismos y genes raros, lo cual aumentaría los costos para el caso de muestras altamente diversas. Aunque genes marcadores como el gen 16S rRNA permite tener información filogenética de una muestra dada, algunos estudios han demostrado la estrecha relación que puede encontrarse entre la estructura filogenética de una comunidad y las funciones que estas realizan (Langille *et al.*, 2013; Muegge *et al.*, 2011).

El algoritmo PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) es un paquete de software bioinformático que utiliza un modelo evolutivo para predecir metagenomas a partir de datos de 16S y de una base de datos de genomas de referencia. PICRUSt realiza la predicción funcional en dos pasos principales (Langille *et al.*, 2013):

- **Inferencia del contenido de genes:** en este paso el contenido de genes es pre-computado para cada organismo en un árbol filogenético, así para cada organismo se tiene una familia de genes.
- **Inferencia del metagenoma:** este segundo paso combina el contenido de genes de todos los taxones microbianos con la abundancia de genes 16S en

una o varias muestras, correlacionando el número de copias de cada gen 16S para generar las abundancias esperadas de las familias de genes en la comunidad.

La disponibilidad de paquete del software PICRUST, junto documentación para implementación de dicha técnica y conjunto de datos de ejemplos se encuentran en el sitio web: <http://picrust.github.com/>.

2. Antecedentes.

2.1. Diversidad microbiana en suelos de manglar.

2.1.1. Análisis del microbioma mediante Metagenómica.

En los ecosistemas de manglar, la composición de las comunidades microbianas está dada de la siguiente manera: las bacterias y los hongos constituyen el 91% de la biomasa microbiana total, mientras que las algas y protozoos representan solo el 7% y el 2% respectivamente (Holguin *et al.*, 2001). En estudios de diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos de manglar se han encontrado presentes ciertos grupos bacterianos como *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Chloroflexi* (Andreote *et al.*, 2012).

Andreote *et al.* (2012) presenta la diversidad microbiana encontrada en tres manglares con distintas condiciones ambientales en Brasil. En todos los manglares encontraron una abundancia significativa en secuencias de *Deltaproteobacterias* y *Gammaproteobacterias*, lo que no es comúnmente observado en muestras de agua o suelo, pero esta relacionado específicamente a ecosistemas de manglar donde las condiciones anaeróbicas seleccionan grupos microbianos específicos como las bacterias sulfato-reductoras. En cuanto a la cantidad de vegetación que varía en los manglares muestreados, la influencia del oxígeno que proporcionan las raíces de mangle interfieren directamente en la composición de las comunidades microbianas adyacentes; por lo tanto, en sitios con vegetación más densa se observó aumento de grupos microbianos microaerófilos como *Actinomycetales* y *Planctomycetaceae* (Andreote *et al.*, 2012).

Nogueira *et al.* (2015) describen cuatro microbiomas de manglares semiáridos vírgenes y antropizados de Brasil mediante secuenciación 454 (GS-FLX Titanium Roche) a partir de sedimentos. En uno de los sitios muestreados encontró una correlación en la disminución de *Gammaproteobacteria* y aumento de *Betaproteobacteria* posiblemente por aumento de condición eutrófica. El estudio permitió detectar varios filotipos en los manglares (*Lentisphaerae*, *Thermotogae*, *Dictyoglomi*, *Aquificae* y *Elusimicrobia*), que son grupos raros y han sido detectados en ambientes extremos, sugiriendo que dichos grupos sean característicos de las regiones semiáridas (Nogueira *et al.*, 2015).

Alzubaidy *et al.* (2016) realizaron un análisis en suelos de manglar en el mar Rojo mediante metagenómica y secuenciación 454 de Roche, con el objetivo de comparar la comunidad microbiana presente en sedimentos de manglar (no rizosférico) con aquella presente en la rizósfera del mangle *Avicennia marina*. En general, todas las muestras presentaron predominancia en grupos como *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, con alta abundancia de reductores de sulfato y organismos metanogénicos. Ellos reportaron una mayor riqueza de especies en suelo rizosférico que en las muestras de sedimento. Los filos dominantes de archaeas en sedimento fueron *Methanosarcinales*, *Thermococcales*, *Methanococcales* y *Methanobacteriales*, mientras que en suelo rizosférico fueron *Halobacteriales* y *Nitrosopumilales*. Se encontraron diferencias tanto a nivel taxonómico como funcional (Alzubaidy *et al.*, 2016).

2.1.2. Diversidad microbiana mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

Ghosh *et al.* (2010) analizaron las comunidades bacterianas presentes en sedimentos de manglar en Sundarban (Bangladés) mediante construcción de librerías del gen 16S rRNA y secuenciación de clones seleccionados, permitieron detectar al menos ocho diferentes filos. Las mayores divisiones bacterianas a nivel de filo fueron *Proteobacteria* (alpha, beta, gamma y delta), *Flexibacteria* (grupo CFB), *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* y *Gammatimonadates*. *Gammaproteobacteria* fue el grupo bacteriano más abundante. Se identificaron clones reportados anteriormente como

responsables del mantenimiento del ciclo del azufre en ambientes salinos (Ghosh *et al.*, 2010).

El uso de nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha permitido detectar más grupos microbianos en manglares. Jiang *et al.* (2013) realizaron secuenciación Illumina del gen marcador 16S rRNA. Encontraron 44 filotipos, donde las mayores abundancias correspondieron a *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Thermomicrobia*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae* y *Bacteroidetes* (Jiang *et al.*, 2013).

Mendes y Tsai (2014) analizaron las variaciones en la estructura de la comunidad bacteriana en sedimentos de manglar a diferentes profundidades en el sureste de Brasil. Ellos reportan que la diversidad bacteriana está determinada por las variaciones en el ecosistema. Las características del sedimento, tales como la profundidad, la conductividad, el pH y el contenido de potasio, presentaron una correlación con los cambios en la estructura general de la comunidad bacteriana (Mendes & Tsai, 2014).

Basak *et al.* (2016) determinaron la diversidad microbiana en sedimentos de un manglar prístino de Sundarbans (Bangladés) mediante la secuenciación del amplicón del gen 16S rRNA. Los análisis taxonómicos mostraron dominancia del filo *Proteobacteria*, seguido de *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes* y el grupo *Fusobacteria* (Basak *et al.*, 2016).

Wu *et al.* (2016) estudiaron las comunidades bacterianas de la rizósfera de tres especies de mangle (*Bruguiera gymnorrhiza*, *Kandelia candel* y *Aegiceras corniculatum*) en el estuario de Beilun (China) mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA. Los análisis filogenéticos indicaron la mayor dominancia de *Proteobacteria*, siendo principalmente *Deltaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, seguido por *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* y *Acidobacteria*. Los análisis estadísticos permitieron encontrar diferencias en las comunidades bacterianas entre las tres especies de mangle, asimismo, órdenes de *Rhodospirillales* fueron significativamente diferentes entre los tres tipos de sedimentos (Wu *et al.*, 2016).

2.1.3. Diversidad de Archaeas en suelos de manglar.

Mendes *et al.* (2012) estudiaron la estructura y composición de las comunidades microbianas de archaeas en sedimentos de manglares tropicales de Brasil localizados en dos sitios diferentes, un manglar prístino y el otro localizado en el área urbana. La estructura de la comunidad se determinó mediante la técnica T-RFLP de fragmentos del gen 16S rRNA amplificado, mientras la composición de la comunidad se determinó mediante amplificación de librerías de clones de 16S rRNA. Los parámetros fisicoquímicos como pH, materia orgánica, potasio y magnesio presentaron correlación con respecto a la estructura de la comunidad, mientras que la composición de la comunidad se distribuyó diferencialmente de acuerdo a la profundidad de las muestras del suelo respecto de la superficie. En muestras de la superficie, el 74,3 % de las secuencias se clasificaron en el filo *Euryarchaeota* y el 25,7% fueron clasificadas en *Crenarchaeota* y *Thaumarchaeota*; sin embargo, en muestras de mayor profundidad, el 24,3% de las secuencias se clasificaron en el filo *Euryarchaeota* y el 75,7% restante en *Crenarchaeota* y *Thaumarchaeota*. Estos hallazgos indican que los manglares poseen una gran diversidad de archaeas que es afectada por las propiedades del sedimento y la profundidad del mismo (Mendes *et al.*, 2012).

Bhattacharyya *et al.* (2015) determinaron la diversidad y distribución de archaea en sedimentos de manglar en Sundarbans mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Ellos reportan la dominancia de los filos *Euryarchaeota* y *Thaumarchaeota*. Los cambios en los patrones de la comunidad de archaeas fueron influenciados por las condiciones de preservación del manglar. En el manglar prístino dominaron las comunidades metanógenicas, y en el manglar con antecedentes de contaminación por hidrocarburos predominaron las haloarchaeas.

Li *et al.* (2016) caracterizaron las comunidades de archaeas en sedimentos de manglares en Dongzhaigang (China) mediante la secuenciación del gen 16S rRNA utilizando la tecnología Illumina Miseq. Encontraron que el filo dominante fue *Euryarchaeota*. La estructura de la comunidad de archaeas presentó diferencias dependiendo de las características fisicoquímicas del sedimento de manglar, dadas por las diferentes plantas de mangle presentes en cada sedimento colectado (Li *et al.*, 2016).

2.2. Potencial biotecnológico de los microorganismos de manglar.

El potencial biotecnológico de los microorganismos de manglar abarca sectores como la agricultura, la industria y farmacéutico (Thatoi *et al.*, 2012). Se han reportado microorganismos de manglar con actividad promotora de crecimiento vegetal. Ravikumar *et al.* (2004) aislaron de la rizósfera de mangle cepas de *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. beijerinckii* con una alta tasa de crecimiento, fijación de nitrógeno y producción de auxinas bajo condiciones salinas de 30g/L de NaCl. Al inocular dichas cepas en plántulas de *R. mangle* se obtuvieron incrementos en la biomasa de raíces (98%), biomasa de vástago (29%), longitud de raíz (48%), área foliar (277%), niveles de clorofila (151%) y carotenoides (158%), en comparación con los controles. Similares resultados se han reportado en suelos salinos de sistemas agrícolas, los cuales se caracterizan por una baja actividad microbiana, ayudando así a obtener una mayor productividad agrícola en estos suelos (Navarro-Noya *et al.*, 2016). A nivel industrial y farmacéutico se han logrado aislar microorganismos con gran aplicabilidad en estos campos, tal es el caso de la cepa *Vibrio fluviales* con alta productividad en proteasa alcalina extracelular de uso en la industria de producción de detergentes (Venugopal & Saramma, 2006). Un caso exitoso de bioprospección a nivel farmacéutico fue el aislamiento del componente antimicrobiano Enniatin G a partir de *Fusarium sp.* (Thatoi *et al.*, 2012; Behera, *et al.*, 2012). Dias *et al.* (2009) aislaron a partir de sedimento de un manglar en Brasil una bacteria del grupo *Vibrionales* con la capacidad de producir diversas enzimas como amilasas, proteasas, esterases y lipasas. Por su parte, Couto *et al.* (2010) aislaron y caracterizaron genes que codifican para una lipasa (LipA) mediante la construcción de una librería metagenómica a partir de sedimento de un manglar en Paraná, Brasil. La enzima LipA hace parte de un grupo de enzimas con importantes aplicaciones biotecnológicas, debido a su amplia especificidad de sustrato, alta selectividad y estabilidad en solventes orgánicos (Dias *et al.*, 2009). Estos estudios demuestran que las bacterias provenientes de suelos de manglar son una fuente de nuevos y potenciales compuestos de interés biotecnológico (Ghizelini *et al.*, 2012).

2.3. Estudio del potencial genético funcional microbiano en suelos de manglar.

Bai *et al.* (2012) estudiaron la diversidad genética funcional de diferentes hábitats de manglar de la Reserva Nacional Natural de China mediante la utilización de microarreglos (GeoChip 4.0). Encontraron que la mayoría de los procesos funcionales fueron detectados en todos los hábitats de manglar, incluyendo fijación de carbono y nitrógeno, degradación de carbono, metabolismo del metano, amonificación, nitrificación, denitrificación, reducción de nitrógeno, reducción del azufre, degradación de contaminantes orgánicos y resistencia a antibióticos. Resultado del análisis de correspondencia canónica mostró que la estructura de la comunidad microbiana es influenciada por las variables ambientales tales como el nitrógeno total, el carbono total, el pH, la relación carbono/nitrógeno y especialmente la salinidad (Bai *et al.*, 2012).

2.4. Predicción funcional

Lopes *et al.* (2016) estudiaron el perfil de la diversidad bacteriana de suelo no rizosférico y rizosférico de caña de azúcar, mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA, así como el análisis *in silico* de la predicción del metagenoma utilizando el software PICRUSt. Encontraron que la abundancia de bacterias en la rizósfera fue mayor. El metagenoma predicho a partir de secuencias del gen 16S rRNA reveló una alta abundancia significativa de los genes predichos asociados con la formación de biofilm y transferencia horizontal de genes.

Lv *et al.* (2016) investigaron las variaciones estacionales de las comunidades bacterianas en sedimentos a lo largo del plano mareal, mediante el análisis de secuencias del gen 16S rRNA y posterior predicción del metagenoma usando PICRUSt. La composición de la comunidad bacteriana difirió significativamente a lo largo del plano mareal y de acuerdo a la estación. La salinidad fue el factor que más influenció la estructura de la comunidad microbiana en el sedimento. Entre las funciones metabólicas predichas encontradas fueron metabolismo del nitrógeno, metano y energético.

3. Planteamiento del Problema.

El suelo posee una diversidad microbiana que juegan un papel importante en el funcionamiento de diversos ecosistemas, ya que afecta los ciclos hídricos, determina la disponibilidad de nutrientes y genera diversos servicios ambientales para el bienestar de la población humana (Holguin *et al.*, 2001). Desde el punto de vista funcional los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y fósforo, permiten la transformación a moléculas vitales como ácidos nucleicos y proteínas; asimismo, estos ciclos biogeoquímicos están gobernados por diversas redes de actividad microbiana que determinan el funcionamiento de los manglares (Alongi, 2009).

Los manglares prestan importantes servicios ambientales como son: provisión de alimento y refugio a aves, peces y crustáceos, muchos de ellos de interés comercial, protección a las comunidades humanas aledañas de las tormentas tropicales como huracanes y tsunamis, almacenamiento de carbono y nitrógeno en sus suelos, la prevención de la erosión de los suelos y la filtración de las aguas contaminadas con desechos de origen doméstico (Lee *et al.*, 2014). A pesar de la importancia ecológica que poseen los bosques de manglar y los microorganismos presentes en el suelo, diferentes actividades humanas han afectado de manera significativa este ecosistema, tales como tala de plantas de mangle para el establecimiento de cultivos agrícolas, proyectos de urbanización, acuicultura y la contaminación con desechos químicos como los metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y contaminantes orgánicos persistentes (Kumar *et al.*, 2016; Marchand *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). A pesar de la plasticidad que poseen los manglares, se cree que se han perdido cerca del 50% de los bosques en el mundo durante la mitad del siglo pasado (Alongi, 2008).

En este sentido, diversos grupos de investigación han planteado diferentes modelos conceptuales del papel ecológico de los microorganismos asociados a manglares, desde

Odum & Heald (1975), Alongi *et al.* (2009), Holguín *et al.* (2001) y Thatoi *et al.* (2013). Lamentablemente, estos modelos han estado limitados a técnicas no moleculares, mediante el cultivo *in vitro* de microorganismos, lo cual representa una mínima parte de la diversidad en los manglares. El desconocimiento de la biodiversidad taxonómica y funcional de microorganismos de nuestros manglares es una pérdida para el desarrollo de políticas de conservación y el desarrollo de procesos de bioprospección para el desarrollo del país.

4. Justificación.

La diversidad microbiana presente en el suelo ha sido estudiada desde distintos enfoques, uno de ellos y el más tradicional ha sido por medio del cultivo y aislamiento de microorganismos, sin embargo, se sabe que sólo es posible aislar entre el 0,01 y el 0,1% de los microorganismos presentes en el suelo (Hugenholtz *et al.*, 1998). Aunque se han hecho avances y mejoras en los métodos de cultivo de estos microorganismos, aún la relación de los microorganismos no cultivables sigue siendo muy grande, por lo tanto, realmente sólo se está logrando tener una visión más amplia, pero aún limitada de la estructura y composición de las comunidades microbianas (Daniel, 2005).

Conocer la composición taxonómica y funcional de las comunidades microbianas del suelo permitirá hacer posible la reconstrucción del potencial metabólico de la comunidad y las interacciones que en esta ocurren; es por eso que se han desarrollado diferentes métodos de secuenciación del ADN, con el fin de estudiar ambientes tan diversos, como el suelo (Simon & Daniel, 2011).

El uso de técnicas de secuenciación de nueva generación para la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA, permite obtener una mayor profundidad de muestreo, comparada con otras metodologías independientes del cultivo de microorganismos, tales como la electroforesis en gel de gradiente denaturante (DGGE) o análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP) (Muyzer *et al.*, 1993; Fierer & Jackson, 2006). Por lo tanto, la estrategia de secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA permite procesar el número deseado de muestras de manera simultánea, con el fin de obtener el perfil de las comunidades microbianas en suelos tan diversos como los suelos de manglar (Zhou *et al.*, 2011).

En la Guajira (Riohacha) existen áreas de marcado deterioro del manglar que podrían requerir acciones de restauración inmediatas (Polanía *et al.*, 2013). A pesar de la relevancia de los microorganismos del manglar para el ciclaje de nutrientes (Alongi, 2009; Odum & Heald, 1975) su diversidad taxonómica y funcional ha sido poco estudiada a nivel genético. Este trabajo aportaría significativamente al entendimiento del papel de los microorganismos de manglar ya que involucra una caracterización de la diversidad taxonómica de las comunidades de bacterias y archaeas mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA, el análisis de los cambios de la diversidad de esas comunidades a lo largo del gradiente de salinidad y la predicción del potencial genético funcional que se pudieran llevar a cabo.

5. Pregunta de investigación.

¿Cuál es la diversidad y el potencial genético funcional de las comunidades de bacterias y archaeas asociadas a la rizósfera de *Avicennia germinans* en un gradiente de salinidad en el manglar de la desembocadura del río Ranchería en La Guajira?

5.1 Hipótesis.

La salinidad y parámetros físico químicos afectan la estructura, la riqueza y diversidad funcional microbiana asociada a la rizósfera de *Avicennia germinans*.

6. Objetivos.

6.1 Objetivo general.

- Identificar la diversidad y predecir el potencial genético funcional de las comunidades bacterianas y archaeas asociadas a la rizósfera del mangle negro (*Avicennia germinans*) en un gradiente de salinidad de en el manglar de la desembocadura del río Ranchería en La Guajira.

6.2 Objetivos específicos.

- Determinar la diversidad de microorganismos asociados a la rizósfera del mangle negro (*A. germinans*) en un gradiente de salinidad.
- Evaluar el efecto de las características fisicoquímicas del suelo sobre la diversidad taxonómica de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera del mangle negro (*A. germinans*).
- Predecir el potencial funcional de la comunidad microbiana asociada a la rizósfera del mangle negro (*A. germinans*).

7. Metodología.

7.1 Descripción del lugar de estudio.

El lugar donde se llevó a cabo el muestreo está ubicado al noreste del municipio Riohacha, capital del departamento de La Guajira, en la orilla de la desembocadura principal del río Ranchería, denominada brazo Riíto (Figura 7-1). Las especies de mangle presentes en el delta del río Ranchería son *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa* y *Conocarpus erectus*; entre las cuales se seleccionó la rizósfera de *A. germinans* debido a que es la especie más tolerante a la salinidad y a climas extremos (Cintrón & Schaeffer-Novelli, 1983) (Figura 7-2).

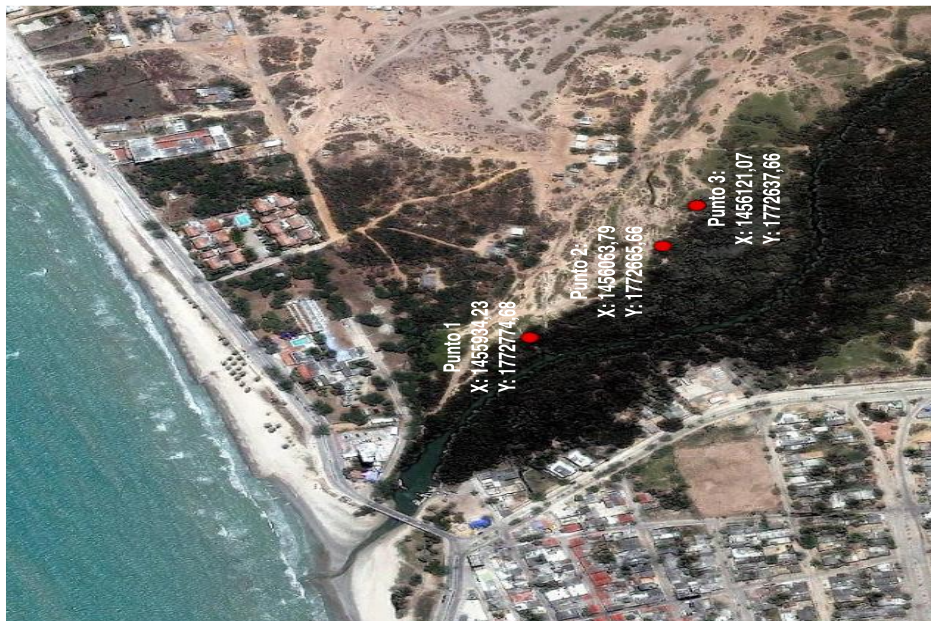


Figura 7-1: Localización de los puntos de muestreo en la desembocadura del río Ranchería, brazo Riíto, coordenadas presentadas en formato Magna Sirgas. Fuente: ArcGIS v. 10.4.

Las tres zonas de muestreo, los niveles de salinidad del agua intersticial, las coordenadas y fecha, se presentan en la tabla 7-1.

Tabla 7-1: Características de las zonas de muestreo.

Punto de muestreo	1	2	3
Geoposición (Coordenadas Magna Sirgas)	Norte/Este 1455934,23/ 1772774,68	Norte/Este 1456063,79/ 1772774,68	Norte/Este 1456121,07/ 1772637,66
Geoposición (Coordenadas WG84)	11°33′08.4"N/ 72°53′59.6"W	11°33′11.4"N/ 72°54′03.5"W	11°33′09.05"N/ 72°54′01.4"W
Fecha del Muestreo	26/Nov/2015	26/Nov/2015	26/Nov/2015
Salinidad del Agua Intersticial	2,80 ppt	14,61 ppt	61,52 ppt

Unidades de salinidad ppt: partes por mil.



Figura 7-2: Fotografía manglar. Delta del río Ranchería (brazo Riíto), La Guajira, Colombia. Fuente: Tomada por Ingrid Paola Figueroa Galvis, 2015.

7.2 Diseño del muestreo

Se escogieron tres zonas de muestreo, para lo cual se tuvo en cuenta que las zonas presentaran niveles de salinidad contrastantes entre estas. Dentro de cada zona, se escogieron tres réplicas de muestreo que consistieron en suelo rizosférico de tres plantas jóvenes de *A. germinans* con altura no superior a 60 cm, cercanas entre sí por una distancia no mayor de 50 cm entre cada planta y con el mismo valor de salinidad del agua intersticial; dichos niveles de salinidad fueron medidos al momento de realizar el muestreo utilizando un refractómetro portátil de salinidad modelo RF20 marca Extech. El suelo rizosférico correspondió a aquel suelo que quedó adherido a la raíz de la planta, luego de extraer la planta junto con su raíz y sacudir vigorosamente esta. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en tubos falcon de 50 cm y estos empacados en bolsas de polipropileno, luego transportadas y almacenadas a -20°C hasta su análisis. Tanto para los análisis fisicoquímicos como los análisis de extracción de ADN, las réplicas se analizaron de manera independiente. Este proyecto contó con la autorización de la Corporación CorpoGuajira para la toma de muestras de suelo en el área especificada (Tabla 7-1).

7.3 Análisis fisicoquímico de suelos.

El análisis fisicoquímico de suelos se realizó según técnicas estándares. El pH del suelo fue medido con el método de relación suelo:agua 1:1 (p/v) por valoración potenciométrica. El contenido de carbono orgánico (CO) fue medido con el método Walkley-Black, y el carbono y nitrógeno total (CT y NT) fueron determinados mediante analizador elemental. Los contenidos de iones intercambiables Ca, K, Mg y Na fueron determinados por extracción con acetato de amonio 1N, pH 7. La acidez de cambio (AI) fue determinada por extracción con KCl 1M, valoración volumétrica y la capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE) mediante la suma de bases más la acidez intercambiables. El fósforo disponible fue medido por el método de Bray II; los niveles de Cu, Fe, Mn y Zn fueron determinados por extracción con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y valorados por absorción atómica. El B fue extraído con fosfato monocálcico y valorado por colorimetría. Las cantidades de arena, limo y arcilla fueron determinadas por el método Bouyoucos, previa dispersión con hexametáfosfato de sodio, y la textura del suelo fue

descrita usando el triángulo de clasificación textural del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

7.4 Determinación de la diversidad microbiana.

7.4.1 Extracción de ADN.

A partir de cada una de las réplicas de suelo rizosférico se realizó individualmente extracción del ADN total con el kit de extracción de ADN PowerLyzer PowerSoil (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración del ADN extraído se midió con un fluorómetro Qubit Invitrogen (Life Technologies, CA) y se observó la integridad del ADN en electroforesis de gel de agarosa al 0,8%. El ADN total extraído fue colocado en tubos eppendorf, obteniéndose en total nueve tubos eppendorf con ADN a partir de cada réplica de muestreo. El ADN fue secuenciado del gen 16S rRNA mediante tecnología Illumina MiSeq.

7.4.2 Amplificación y Secuenciación del gen 16S ADN ribosomal

El proceso de amplificación y secuenciación incluyó los siguientes pasos:

- La librería de las muestras fueron preparadas como se describe en el protocolo de preparación de librerías de secuenciación para 16S metagenómica, Parte # 15044223 Rev. B (Illumina Inc., San Diego, California, USA) con las siguientes modificaciones:
- La región variable V3/V4 del gen 16S rRNA fue amplificada con los *primers* anidados V3F y V4R descritos por Klindworth *et al.* (2013):

Primer	Dirección	Secuencia (5' a 3')
V3F	sentido	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTACGGGNGGCWGC AG
V4R	antisentido	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTACHVGGGTATC TAATCC

- Los *primers* fueron modificados para agregar las secuencias de los adaptadores de Illumina, dirigidos a secuencias específicas del gen (Klindworth *et al.*, 2013). La cobertura de los *primers* en el gen 16S ADN ribosomal de *E. coli* se ilustra en la figura 7-3.
- Después de la amplificación inicial, el tamaño de la librería fue verificado en un chip Agilent DNA1000, y fue realizada una limpieza usando un volumen 1x AxyPrep Mag PCR clean-up beads (Axygen Biosciences, Union City, CA).
- Los índices duales de Illumina y los adaptadores de secuenciación fueron agregados usando los siguientes *primers*: *Forward primer*, 5'-AATGATACGCGACCAACGAGATCTACAC[55555555]ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3', *Reverse Primer*, 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[77777777]GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT -3'. Las secuencias entre corchetes son los adaptadores índices duales de Illumina D501-D508 y D701-D712).
- Después de una PCR, se realizó la limpieza de la librería usando un volumen 1x de AxyPrep Mag PCR clean-up beads (Axygen Biosciences).
- La calidad y cuantificación de las librerías terminadas fue realizado usando un Agilent DNA1000 chip y Qubit® dsDNA HS Assay Kit, respectivamente.
- Las librerías fueron estandarizadas a 2µM y mezcladas antes del proceso de secuenciación.
- Secuenciación pareada, de 300 bp de longitud fue realizado usando el secuenciador Illumina MiSeq y un cartucho de secuenciación MiSeq 600 bp (v3).
- Las imágenes fueron analizadas usando el Pipeline estándar de Illumina, versión 1.8.2.

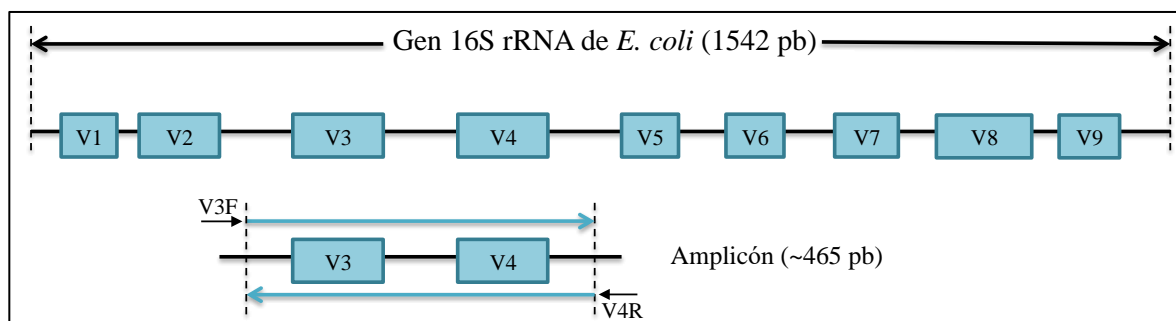


Figura 7-3: Cobertura de *primers* V3F y V4R en el gen 16S ADN ribosomal de *E. coli* y tamaño del amplicón generado. Fuente: Cai *et al.*, 2013 (con modificaciones).

7.5 Análisis Bioinformático.

7.5.1 Ensamblaje de pares de secuencias crudas y primer filtro de calidad.

Se realizó la organización de los datos de secuencias a partir de muestras individuales teniendo en cuenta los *barcodes* o las secuencias etiquetas que identifican cada muestra, de esta manera se agruparán las lecturas por muestras.

- Las secuencias con errores en los *barcodes* y en los *primers* fueron eliminadas.
- Se llevó a cabo el ensamblaje o alineamiento de los pares de secuencias *forward* y *reverse*, obteniendo *contigs* por cada par de secuencias.
- Se realizó la filtración de secuencias ensambladas, teniendo en cuenta sus longitudes, seleccionando aquellas secuencias sin ninguna ambigüedad en sus bases de nucleótidos y con longitud máxima de 490 pb. Asimismo, se eliminaron las secuencias idénticas duplicadas, dejando una sola, sin afectar los conteos de abundancia.

7.5.2 Alineamiento de secuencias a base de datos SILVA.

- Se realizó el alineamiento de las secuencias con la base de datos SILVA con el fin de hacer la clasificación taxonómicamente usando como referencia SILVA para bacteria y archaea, la cual es una base de datos de secuencias de RNA ribosomal curada (Quast *et al.*, 2013). El método de alineamiento usado fue Needleman.
- Mediante algoritmo de enlace pseudo-único (*pseudo-single linkage algorithm*) se eliminaron secuencias que probablemente se generaron por errores de secuenciación. Se agruparon o fusionaron secuencias con diferencias de hasta dos nucleótidos (Huse *et al.*, 2010). Asimismo, se fusionaron secuencias con diferencias de hasta dos nucleótidos, mediante alineamiento con el algoritmo Needleman (Gotoh, 1982).

- Por medio del algoritmo UCHIME implementado en Mothur, se identificaron secuencias potencialmente quiméricas, las cuales fueron posteriormente eliminadas según Edgar *et al.* (2011).
- Se llevó a cabo el agrupamiento de las secuencias en OTUs con un 97% de similitud entre estas, y posteriormente se realizó la clasificación taxonómica de los OTUs (Bonder *et al.*, 2012).
- Se obtuvieron dos tablas de información necesaria para posteriores análisis estadísticos; una tabla del conteo de OTUs para cada punto de muestreo, así como una tabla de clasificación taxonómica para cada OTU.

7.5.3 Análisis de la diversidad microbiana.

Debido a que se obtuvieron nueve grupos de datos, producto de la secuenciación de nueve extracciones de ADN de diferentes colectas de suelo cada una, dentro de tres niveles contrastantes en salinidad, se realizaron los diferentes análisis de diversidad de manera separada para cada uno de los nueve grupos de datos.

- Se calcularon índices de diversidad alfa, con el fin de observar los cambios en las comunidades dentro de cada muestra. Los índices de diversidad calculados corresponden a índice de Shannon, índice de Simpson e índice del inverso de Simpson, así como perfiles de diversidad de Rényi (Rényi, 1961).
- Se realizó el cálculo de estimadores de la beta-diversidad, para obtener los cambios en las comunidades dentro de cada muestra y entre las diferentes muestras respectivamente. Se realizó el cálculo del índice inverso de Simpson para determinar la homogeneidad de la abundancia relativa en los diferentes OTUs que componen a la riqueza.

7.5.4 Predicción funcional y visualización.

El análisis de predicción del potencial funcional de la comunidad microbiana se realizó a través de secuencias del gen 16S rRNA utilizando el algoritmo PICRUSt v. 1.0.0 (Langille *et al.*, 2013). Los siguientes ítems describen los pasos seguidos para realizar la predicción funcional del metagenoma:

- PICRUST requiere de una clasificación de OTUs y sus abundancias en el formato BIOM (*The Biological Observation Matrix*), para lo cual se generó la conversión a partir de datos de salida de Mothur a la tabla requerida.
- Se realizó una normalización de la tabla de OTUs, teniendo en cuenta el número de copias del gen 16S ADN ribosomal pre-calculadas en archivo de PICRUST.
- Se realizó la predicción del metagenoma funcional, con el fin de obtener tabla de funciones en Ortología KEGG (KO) por cada muestra.

La visualización de datos de predicción funcional se elaboró mediante el paquete de software gráfico STAMP (*statistical analysis of taxonomic and functional profiles*) versión 2.1.3 (Parks *et al.*, 2014).

7.6 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos fisicoquímicos de suelos se utilizó el paquete estadístico de R, se calculó el promedio de cada parámetro medido a partir de las tres réplicas por punto de muestreo, se determinó diferencias significativas entre los tres puntos de muestreo (contrastantes en el nivel de salinidad) por medio de análisis de una vía y el test Tukey. Asimismo se determinó la corrección para cada parámetro en el punto de muestreo correspondiente. Se determinó la correlación entre las variables a través del test de Pearson. Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) entre las variables.

Para el análisis estadístico de los datos de diversidad microbiana, se calcularon curvas de rarefacción, índices de alfa-diversidad tales como índice de diversidad inversa de Simpson ($1/S$) e índice de Shannon, asimismo se realizó un análisis de correspondencia canónica para identificar relaciones en la estructura de la comunidad y los parámetros fisicoquímicos en las muestras, esto se llevó a cabo utilizando el paquete de R (v. 3.3.1), *vegan* v. 2.4.1 (Oksanen *et al.*, 2007). Las abundancias relativas de los grupos taxonómicos encontrados fueron analizados empleando el paquete de R, *phyloseq* v. 1.6.0 (McMurdie & Holmes, 2013). La similitud de la comunidad microbiana fue calculada usando el índice de Bray Curtis y esto se visualizó mediante el agrupamiento jerárquico, graficado en el software FigTree v. 1.4.2 (Magurran, 2013; Rambaut, 2014)

Para el análisis de abundancias diferenciales entre las muestras se utilizó el paquete de R, metagenomeSeq v. 1.17.0 (Paulson, 2014). Los datos de predicción funcional fueron analizados utilizando el software STAMP versión 2.1.3 (Parks *et al.*, 2014), se realizó análisis de componentes principales (PCA) para las enzimas predichas y las funciones metabólicas se analizaron con el test Welch's *two sided*, eliminando funciones no clasificadas y filtrándolas con p-valor menor a 0,05 y diferencia entre las proporciones de al menos el 1%.

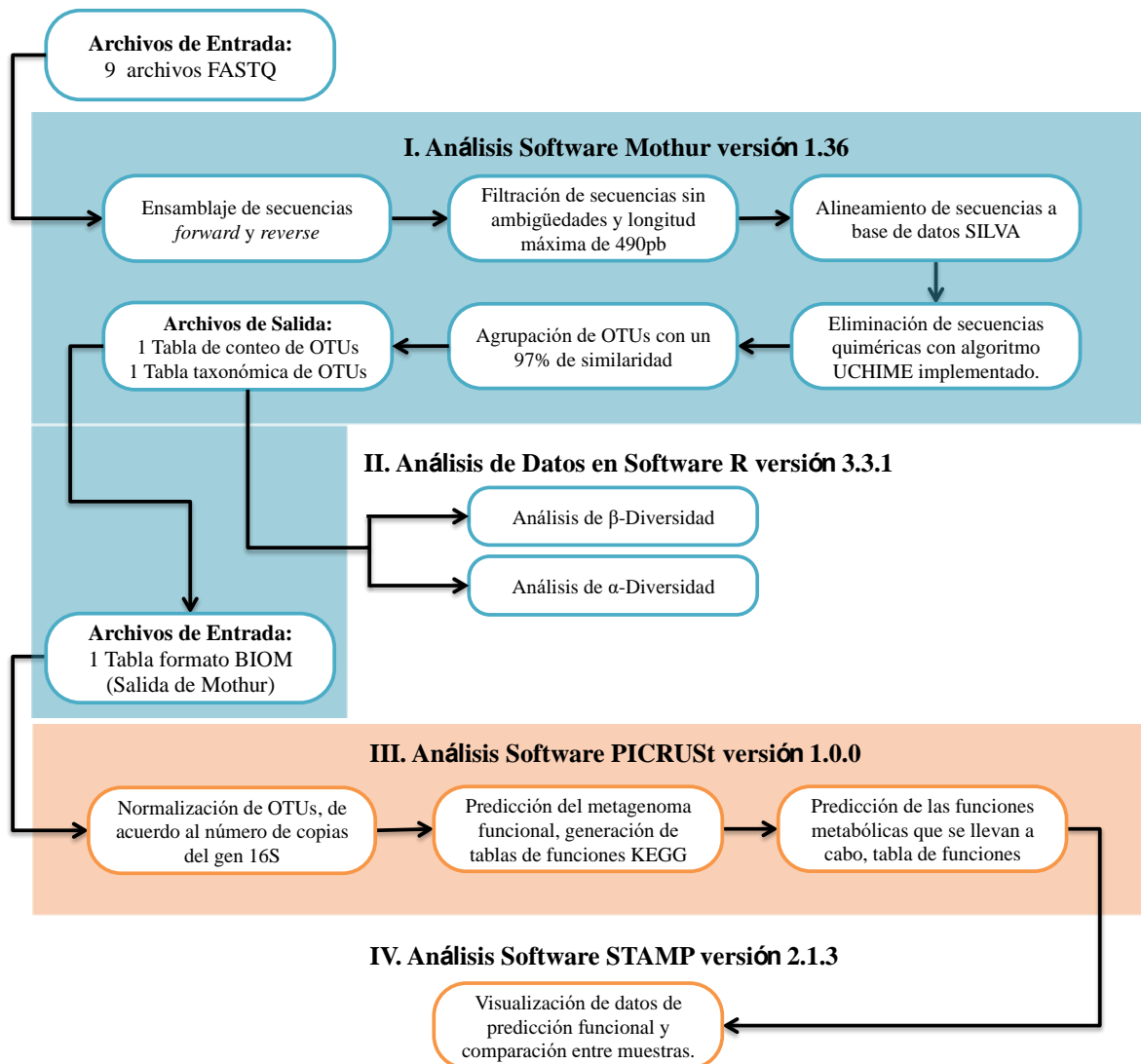


Figura 7-4: Esquema que resume el análisis bioinformático llevado a cabo en la metodología (flujo de trabajo).

8. Resultados y Discusión.

8.1 Análisis fisicoquímico del suelo rizosférico.

En la tabla 8-1 se presenta el análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos de suelo rizosférico de *A. germinans* por cada zona de muestreo, las cuales fueron contrastantes en el nivel de salinidad del agua intersticial. No se presentó diferencias significativas entre las zonas de muestreo para variables como % NT, Ca, K, Mg, P, S, Cu, % Ar, % L y % A (Tabla 8-1).

Tabla 8-1: Valores promedios y error estándar (en paréntesis) de los parámetros fisicoquímicos en las tres zonas de muestreo de suelo rizosférico de *A. germinans*.

Parámetros	Zonas de muestreo			P (Tukey HSD)
	Salinidad Intersticial Baja n=3	Salinidad Intersticial Media n=3	Salinidad Intersticial Alta n=3	
pH	7,87 (0,09)b	7,97 (0,15)b	8,43 (0,02)a	**
CE (dS/m)	24,23 (3,88)c	39,49 (3,52)b	58,93 (6,14)a	***
% CO	0,6 (0,07)a	0,41 (0,03)b	0,22 (0,01)c	***
% CT	0,69 (0,13)a	0,32 (0,04)b	0,13 (0,03)b	**
% NT	0,08 (0,03)a	0,06 (0,01)a	0,05 (0,03)a	ns
Ca (meq/100g)	5,42 (0,13)a	10,73 (2,27)a	9,04 (0,16)a	ns
K (meq/100g)	0,52 (0,01)a	0,69 (0,07)a	0,7 (0,03)a	ns
Mg (meq/100g)	4,79 (0,15)a	6,65 (0,76)a	6,33 (0,23)a	ns
Na (meq/100g)	8,5 (0,58)b	15,18 (3,85)ab	24,54 (1,51)a	**
CIC (meq/100g)	19,23 (0,37)b	33,25 (6,91)ab	40,61 (1,81)a	**
P (mg/kg)	97,01 (4,18)a	102,96 (7,05)a	78,95 (3,6)a	ns
S (mg/kg)	197 (12,77)a	331,67 (77,72)a	274,33 (18,19)a	ns
Cu (mg/kg)	1,68 (0,3)a	1,99 (0,38)a	1,03 (0,02)a	ns

Fe (mg/kg)	78,83 (10,69)a	57,6 (10,62)ab	42,1 (1,07)b	*
Mn (mg/kg)	28,96 (2,91)a	24,92 (3,22)a	11,31 (2,25)b	**
Zn (mg/kg)	1,27 (0,04)a	1 (0,2)ab	0,66 (0,09)b	**
B (mg/kg)	2,26 (0,09)a	1,9 (0,14)a	2,13 (0,1)a	ns
% Ar	12,67 (2,4)a	16,67 (0,67)a	15,33 (0,67)a	ns
% L	28 (3,46)a	40 (7,21)a	26 (2)a	ns
% A	59,33 (3,71)a	43,33 (7,42)a	58,67 (1,76)a	ns

CE: conductividad eléctrica; CO: carbono orgánico; CT: carbono total; NT: nitrógeno total; Ca: calcio; K: potasio; Mg: magnesio; Na: sodio. CIC: capacidad de intercambio catiónico; P: fósforo; S: azufre; Cu: cobre; Fe: hierro; Mn: manganeso; Zn: cinc; B: boro; Ar: arcilla; L: limo y A: arena. n= número de réplicas. Letras diferentes en cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas, según análisis de comparaciones múltiples de Tukey. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: $p > 0,05$ o no significativo.

Los parámetros calcio, potasio y magnesio no presentaron diferencias significativas entre las tres zonas de muestreo con valores altos en suelos (6 meq/100g, 0,35 meq/100g y de 2,5 meq/100g respectivamente). El alto contenido de cationes indica alta disponibilidad de nutrientes para las plantas de manglar presentes en dichos suelos, ya que estos cationes serán intercambiados por otros cationes o iones de hidrógeno presentes en la solución del suelo y liberados por las raíces de las plantas de manglar (FAO, 2016).

Se presentaron diferencias significativas entre las zonas de muestreo en las variables pH, CE, CO, CT, Na, CIC, Fe, Mn y Zn. El pH del suelo en las tres zonas de muestreo se encontró entre 7,87 y 8,43 que corresponde a suelos moderadamente alcalinos, lo cual afecta el crecimiento vegetal, la solubilidad de iones metálicos y la actividad microbiana (Bronick & Lal, 2005). Zhalnina *et al.* (2015) reportaron que el pH del suelo determina la composición, diversidad y biomasa microbiana. Ellos consideran que el mecanismo más probable del impacto del pH en la comunidad microbiana se debe a la mediación de este parámetro en la disponibilidad de nutrientes (Zhalnina *et al.*, 2015). Asimismo, Cho *et al.* (2016) compararon la diversidad bacteriana mediante secuenciación del gen 16S rRNA en dos suelos contrastante en su pH. Ellos encontraron que el pH afecta la diversidad microbiana, el suelo ácido (pH 5,2) albergó mayormente *Proteobacteria*, mientras que el suelo neutro (pH 7,7) albergó en una mayor proporción *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Cho *et al.*, 2016). Otros estudios que analizaron la variación de la comunidad microbiana

basados en 16S rRNA en diferentes biomas, mostraron que el pH fue el único factor que explicó la composición de la comunidad a nivel de *phylum* (Fierer & Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2009).

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) mostró diferencias entre las zonas de muestreo y se correlacionó con la salinidad del agua intersticial. Los valores de capacidad de intercambio catiónico encontrados concuerdan con los valores en suelos de diferentes manglares, los cuales están entre 10,63 a 34,75 meq/100g (Ukpong, 1997; Hossain & Nuruddin, 2016). El análisis de las comunidades microbianas mediante técnicas de secuenciación de 16S rRNA y técnicas de perfiles basadas en lípidos para hongos, archaea, fueron fuertemente influenciadas por los factores edáficos pH del suelo y CIC; además, la CIC explicó la más grande disimilitud de la comunidad de grupo *Acidobacteria* en un 11,6% (Docherty *et al.*, 2015).

Los suelos de manglar en los tres puntos de muestreo presentan un porcentaje predominante en arenas seguido de limos y la menor fracción son las arcillas. Se ha reportado que el desarrollo microbiano puede verse afectado por la estructura y textura del suelo, en suelos con texturas finas hay mayor actividad microbiana que en suelos con texturas gruesas (Hassink, 1994). Esto puede estar relacionado a una menor formación de agregados y microagregados en suelos con texturas gruesas, lo cual influye en la disminución de la presencia de microorganismos en tales características del suelo (Aponte *et al.*, 2014). Un estudio de las comunidades fúngicas y bacterianas de suelo en Francia, muestra que los parámetros de pH, textura y el tipo de uso del suelo explican de manera predominante la composición de las comunidades (Prevost-Boure *et al.*, 2014).

8.2 Análisis de Componentes Principales de los parámetros fisicoquímicos en muestras de suelo rizosférico.

Se compararon las tres zonas de muestreo mediante un análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros fisicoquímicos (Figura 8-1). Las réplicas tomadas de

zona de salinidad baja se denominaron 1A, 1B y 1C; las réplicas de salinidad media se denominaron 2A, 2B y 2C; las réplicas de salinidad alta se denominaron 3A, 3B y 3C.

El PCA explicó el 77,7% de la variabilidad de los datos y permitió separar las tres zonas de muestreo. Las réplicas de la zona de baja salinidad fueron agrupadas en relación a los niveles de B y N total; las réplicas de la zona de salinidad media fueron agrupadas en relación al pH, CE y Na. Sin embargo, las réplicas de la zona de salinidad media no presentaron una fuerte agrupación entre estas. Las réplicas 2A y 2C se agruparon por los niveles de conductividad eléctrica, potasio, magnesio, calcio, azufre y arcillas, mientras que la réplica 2B estuvo influenciada por los niveles de CO, Mn, P, Cu y limos.

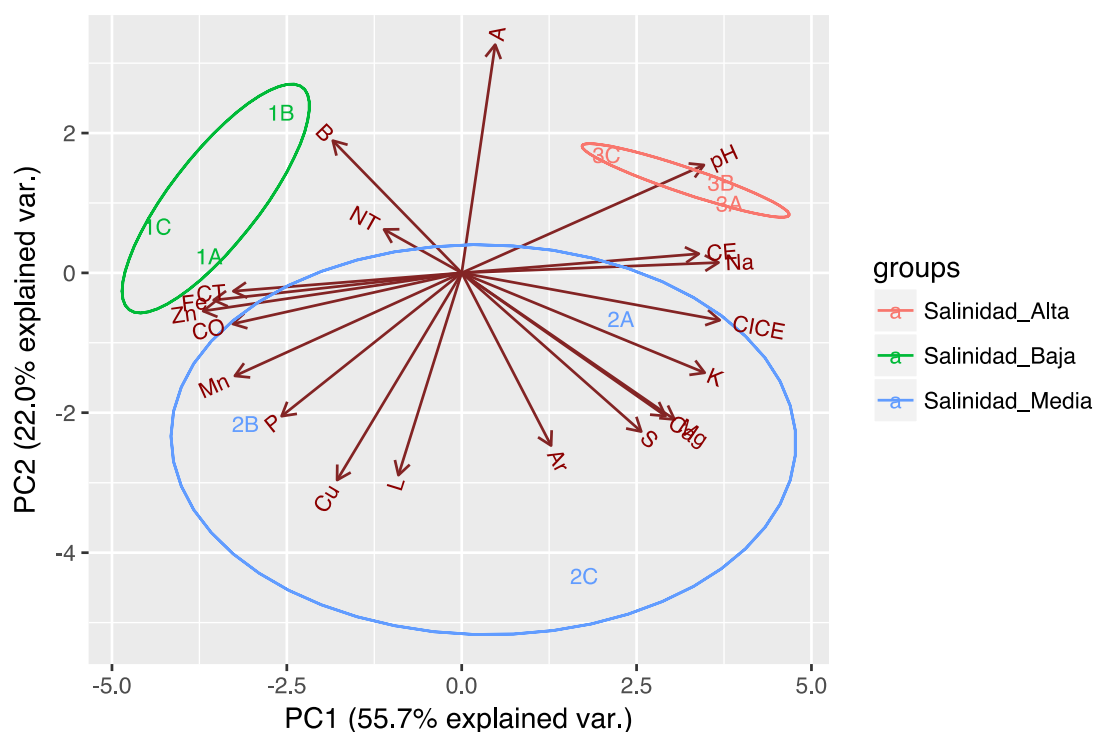


Figura 8-1: PCA de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo rizosférico. Las réplicas tomadas de la zona de salinidad baja se denominaron 1A, 1B y 1C, réplicas de zona de salinidad media 2A, 2B y 2C; y réplicas de zona de salinidad alta 3A, 3B y 3C.

8.3 Extracción de ADN.

El ADN total extraído del suelo rizosférico y utilizado para secuenciación se observa en la figura 8-2. El ADN se caracterizó por ser de alto peso molecular, de una banda de tamaño aproximado de 20 kb, así como de concentración mínima de 20 ng/μL.

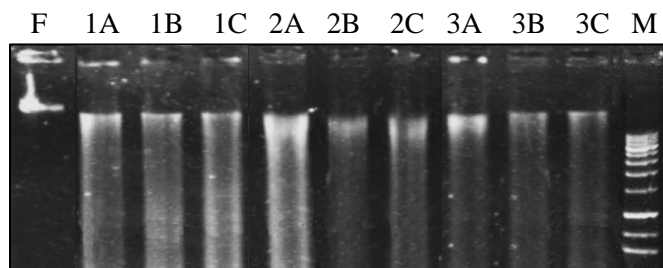


Figura 8-2: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con *Sybr Safe* del ADN total extraído a partir de suelo rizosférico.

ADN extraído de suelo rizosférico, a partir de la zona de baja salinidad (1A, 1B, 1C), a partir de la zona de salinidad media o moderada (2A, 2B, 2C), a partir de la zona de salinidad alta (3A, 3B, 3C), F (fago Lambda 48kb), M (HyperLadder 10 kb).

8.4 Análisis de calidad de las secuencias.

Las secuencias crudas del gen 16S rRNA fueron secuenciadas por la Universidad de Wisconsin-Madison, USA mediante tecnología Illumina MiSeq, y se obtuvieron un total de 1'122.570 lecturas pareadas.

Los análisis de calidad de las lecturas crudas o resultantes del proceso de secuenciación sin ningún procesamiento, se realizó utilizando el programa FastQC v. 0.10.1 (Andrews *et al.*, 2010). La longitud de cada lectura cruda tanto *forward* como *reverse* fue de 300 pb, los valores de medias de calidad de las lecturas crudas fue calculado con el programa MultiQC v. 0.8 (figura 8-3). Teniendo en cuenta que en las tecnologías de secuenciación de nueva generación como Illumina, el puntaje de calidad Phred referencia es de 30, en el cual se consideran las lecturas perfectas y con cero errores. Se encontró que las lecturas

forward presentaron una caída del puntaje de calidad Phred a partir de la base ~260, mientras que las lecturas *reverse* presentaron una caída del puntaje de calidad Phred a partir de la base ~200. Ha sido reportado que el menor puntaje de calidad de las lecturas *reverse* especialmente en la región terminal, en comparación con las lecturas *forward*, es de esperarse en ésta tecnología (Sinclair *et al.*, 2015).

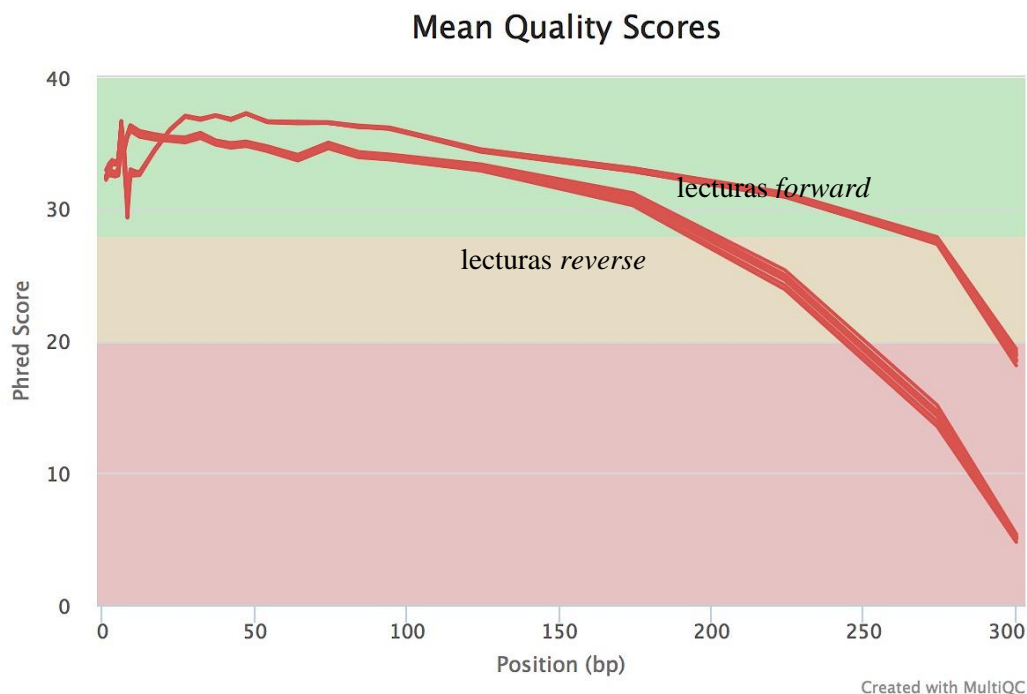


Figura 8-3: Valores de medias de los puntajes de calidad de las secuencias crudas a lo largo de la longitud de las mismas, calculados con el programa MultiQC v. 0.8.

8.5 Análisis de diversidad de las comunidades microbianas.

El total de secuencias ensambladas a partir de las lecturas *forward* y *reverse* con el software Mothur v. 1.36, fue de 838.655 secuencias y la longitud media fue de 463 pb. A partir de las secuencias ensambladas se obtuvieron la tabla de conteo de OTUs por cada réplica de las zonas de muestreo y la tabla de clasificación taxonómica para cada OTU.

Se obtuvieron 605.492 secuencias clasificadas en OTUs de bacterias y archaeas para las 9 réplicas. El número de secuencias de 16S rRNA clasificadas en OTUs obtenidas para el total de las 9 réplicas, presentan un valor mayor al número de secuencias obtenidas por otros autores en trabajos similares, por ejemplo, 20.380 secuencias a partir de 3 muestras (cada una con 4 réplicas) fueron clasificadas en OTUs por Gomes *et al.* (2014), 44.360 secuencias a partir de 29 muestras fueron clasificadas en OTUs por Ligi *et al.* (2014), 218.147 secuencias a partir de 12 muestras fueron clasificadas en OTUs por Jiang *et al.* (2013), 556.274 secuencias a partir de 9 muestras fueron clasificadas en OTUs por Wu *et al.* (2016).

8.5.1 Curva de Rarefacción.

Se realizó la construcción de curvas de rarefacción para cada una de las réplicas tomadas en los puntos de muestreo, mostrando en el *eje y* el número de OTUs observados y clasificados en un nivel filogenético dado, y en el *eje x* el número de lecturas muestreadas (Figura 8-4).

En todas las muestras se obtuvo una riqueza de hasta 58.990 OTUs. Otros estudios en los que se ha evaluado el gen 16S rRNA en suelos de manglar reportan un número máximo de OTUs de 1.872 (Ligi *et al.*, 2014), 39.207 (Jian *et al.*, 2013), 42.942 (Wu *et al.*, 2016) y 4.560 (Gomes *et al.*, 2014). Esto evidencia una alta diversidad en las muestras del presente estudio.

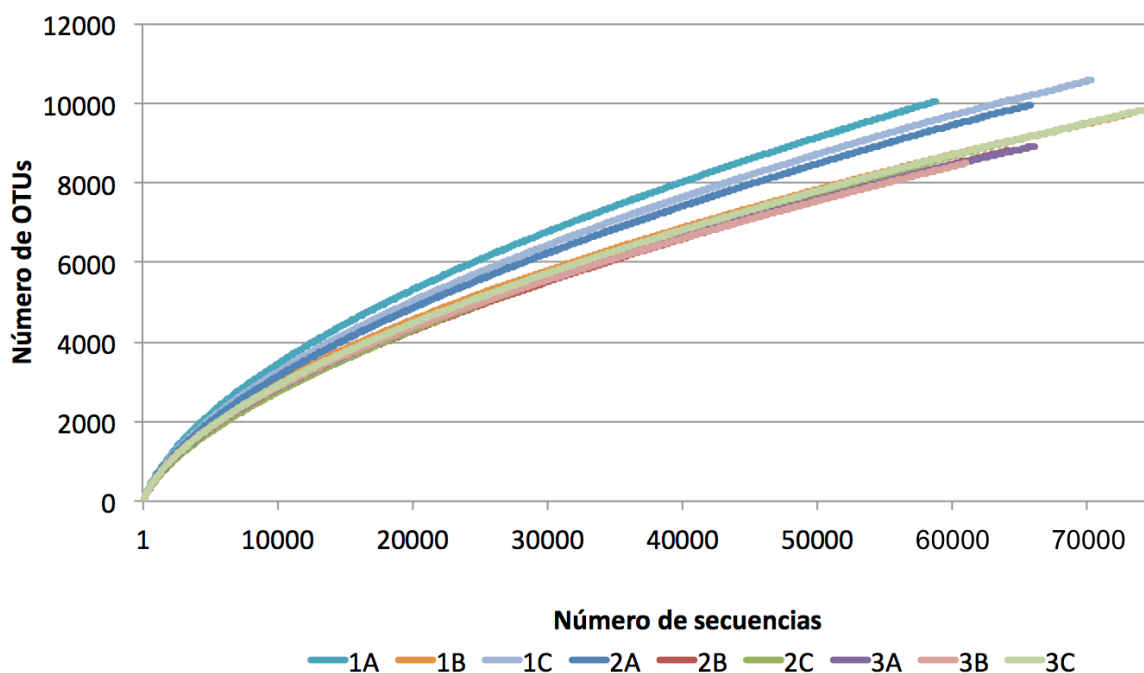


Figura 8-4: Curvas de rarefacción del número de OTUs con un 97% de similitud en las réplicas de muestreo. 1A, 1B y 1C: réplicas en zona de baja salinidad; 2A, 2B y 2C: réplicas en zona de salinidad media; 3A, 3B y 3C: réplicas en zona de salinidad alta.

8.5.2 Índices de Alfa-Diversidad.

La tabla 8-2 muestra los valores promedio de los índices de diversidad de Shannon e índice del inverso de Simpson. La riqueza y el índice de diversidad de Shannon no presentaron diferencias significativas asociadas al nivel de salinidad en las zonas de muestreo. Sin embargo, se observa que la riqueza disminuyó a media que aumentó la salinidad.

Debido a que el índice de diversidad de Shannon se basa en la riqueza de los taxones comunes observados, se encontró en la muestra de baja salinidad un valor del índice de 6,95 y en las muestras 2 y 3 de salinidades media y alta la diversidad de Shannon es de 6,66 y 6,81 respectivamente. Estos valores obtenidos de la diversidad de Shannon son menores en comparación a los calculados en el trabajo de Jiang *et al.* (2013), en el cual

estudiaron la diversidad bacteriana en diferentes áreas de un manglar en China obteniendo una diversidad de Shannon promedio en suelo rizosférico de 7,38. Sin embargo, la diversidad de Shannon encontrada en el área de marisma, la cual no tiene vegetación, fue de 6,93 (Jiang *et al.*, 2013).

Los valores de la diversidad inversa de Simpson (1/D) mostraron diferencias significativas entre las muestras de salinidad baja y media (Tabla 8-2). Dado que los valores de 1/D aumentan a medida que aumenta la complejidad microbiana, por lo tanto se presentó una mayor complejidad en las comunidades microbianas de salinidad baja, siguiendo la de salinidad alta y por último, la complejidad más media estuvo en la muestra de baja salinidad (Lemos *et al.*, 2011).

Tabla 8-2: Valores promedio de riqueza y diversidad microbianas para cada zona de muestreo.

Zona de muestreo	Salinidad Baja n=3	Salinidad Media n=3	Salinidad Alta n=3	P (Tukey HSD)
Riqueza (No. de OTUs)	10.118,67(251,05)ab	9.266,33 (351,66)b	9.088,33 (406,78)b	ns
Diversidad (Shannon)	6,95 (0,07)a	6,66 (0,11)a	6,81 (0,04)a	ns
Complejidad (1/D)	309,58 (21,96)b	129,02 (22,58)a	246,58 (18,52)ab	*

n=número de réplicas. Letras diferentes en cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas, según análisis de comparaciones múltiples de Tukey. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: $p > 0,05$ o no significativo.

8.5.3 Perfiles de Entropía de Rényi.

Se calcularon los perfiles de entropía de Rényi para las abundancias de grupos taxonómicos bacterianos en las muestras, analizando cada réplica por separado (Figura 8-5). El eje x muestra la escala utilizada para denotar valores de entropía (α), el eje y muestra H_α o el número de especies en una misma medida de entropía. Las líneas verdes intermitentes representan los valores máximos y mínimos de diversidad, la línea intermitente rosa representa la mediana de la diversidad de todas las muestras y sus

réplicas, los círculos azules representan los valores de diversidad observados en cada réplica de muestreo.

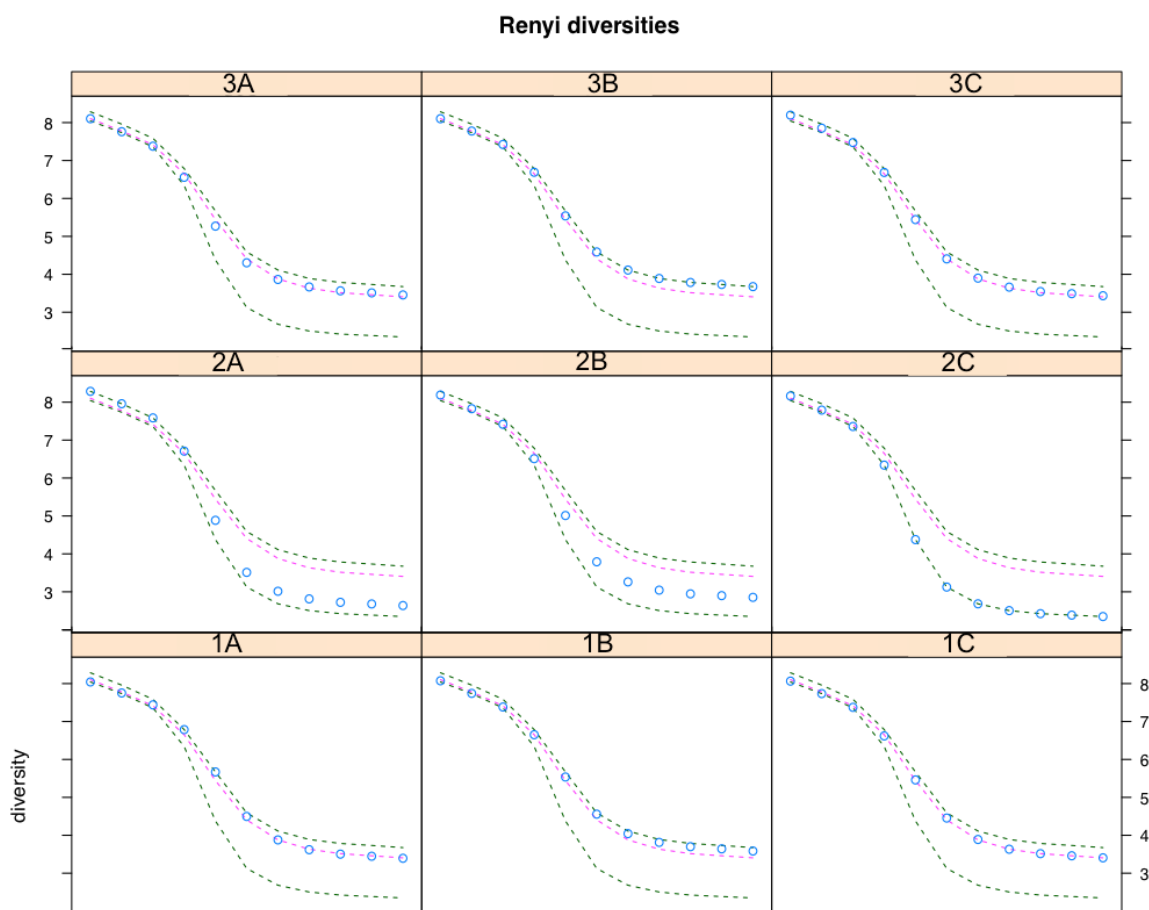


Figura 8-5: Perfiles de diversidad de Rényi para cada réplica de muestreo.

Dentro de cada punto de muestreo se puede observar que la réplica 3B tiene la mayor diversidad bacteriana, mientras que la réplica 2C presenta la menor diversidad. En general, las réplicas de los puntos de muestreo 1 y 3 (salinidad baja y alta, respectivamente) presentan una diversidad alta en sus poblaciones bacterianas, siendo la diversidad de estas (círculos azules) igual o por encima de la mediana de la diversidad de todas las réplicas de muestreo (línea rosa). Las réplicas del punto de muestreo 2 (salinidad media) presentan en general una baja diversidad bacteriana, ya que están por debajo de la mediana de la diversidad de todas las réplicas.

En resumen, se puede decir que a moderada salinidad, se presentó la menor diversidad microbiana; mientras que, a las salinidades bajas y altas se presentó mayor diversidad microbiana.

8.5.4 Índice de Beta-Diversidad.

Las diferencias en las comunidades bacterianas entre los sitios de muestreo (contrastantes en salinidad), se llevó a cabo, realizando el análisis de beta-diversidad mediante el agrupamiento y cálculo de distancias de Bray Curtis (Figura 8-6).

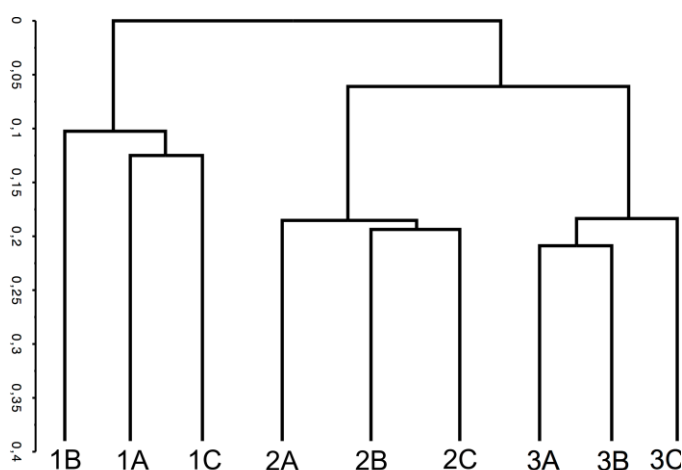


Figura 8-6: Análisis del agrupamiento del perfil de OTUs de acuerdo a las distancias de Bray Curtis.

Como se puede observar en el análisis de agrupamiento (Figura 8-6), las muestras de suelo rizosférico a partir de la misma locación y nivel de salinidad, se agruparon estrechamente. Los suelos se agruparon en dos grandes grupos; el primero agrupa las muestras de suelo de salinidad media y alta (2 y 3), mientras que el segundo grupo lo conformó las réplicas de la muestra de salinidad baja (1). En general, las distancias de las muestras estuvieron dentro del rango 0.38-0.87, lo que indica que todas las muestras de suelo compartieron una alta tasa de similitud en su estructura filogenética.

8.6 Correlación de las características fisicoquímicas de las muestras y estructura de las comunidades microbianas.

El análisis de correspondencia canónica se realizó con el fin de identificar la influencia de los parámetros fisicoquímicos en la estructura de la distribución de OTUs identificados. En la figura 8-7 se observa la distribución de OTUs demarcados en cruces rojas, así como la influencia de las variables salinidad, carbono orgánico (CO) y arcilla.

El primer eje o CCA1, el cual fue negativamente correlacionado con salinidad y arcilla, pero positivamente correlacionado con carbono orgánico, explicó el 58% de la distribución de OTUs observada. El segundo eje o CCA2, el cual fue negativamente correlacionado con arcilla y positivamente correlacionado con salinidad y carbono orgánico, explicó el 27% de la distribución de OTUs observada. Se encontró que las variables salinidad y CO explican de manera inversa las diferencias en los cambios de la distribución de OTUs entre las muestras 1 y 3, con salinidad contrastante; mientras que la arcilla explica diferencias en la distribución de OTUs entre las muestras 2 y las muestras 1 y 3.

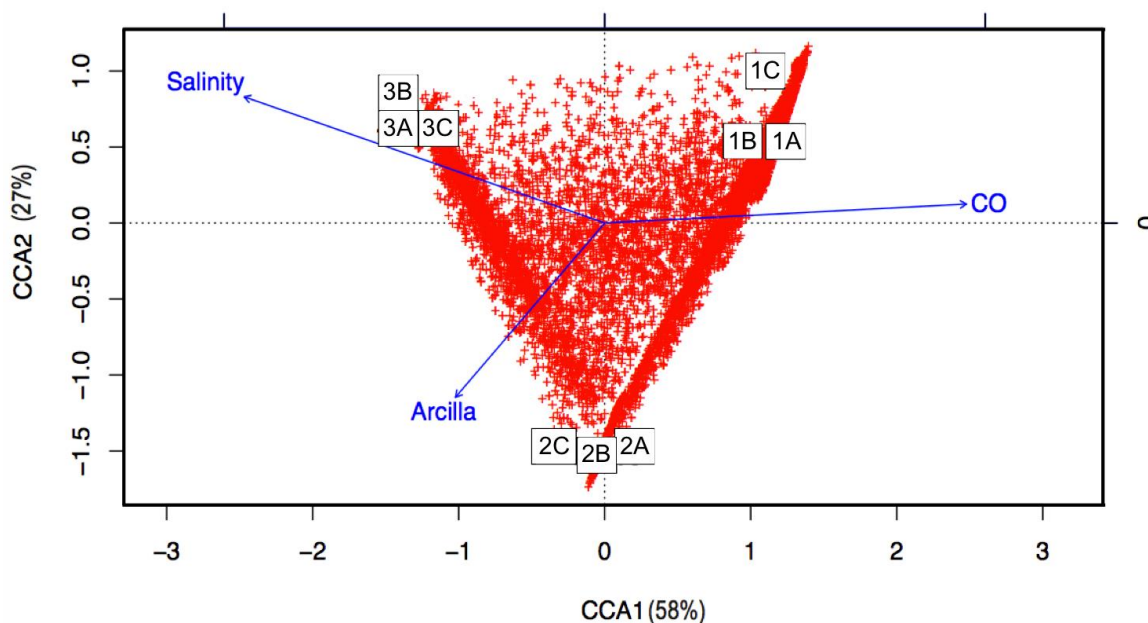


Figura 8-7: Análisis de correspondencia canónica (CCA) ilustrando las relaciones entre la estructura de OTUS (cruces rojas) y las variables ambientales CO, arcilla y salinidad.

Los cambios observados en la estructura de OTUs debido al gradiente de salinidad (Figura 8-7), también ha sido reportado por Canfora *et al.* (2014), trabajo en el cual se observó la fuerte influencia de la concentración de sal en el suelo que afectó la estructura de la comunidad bacteriana. La influencia de la alta concentración de sales en el suelo sobre los microorganismos, se explica mediante los cambios de la disponibilidad de agua y nutrientes que tiene lugar en dicha condición, en la cual, también existen influencias directas e indirectas sobre el contenido de materia orgánica del suelo (Mavi *et al.*, 2012; Rietz & Haynes, 2003). Asimismo, se ha demostrado el efecto de la salinidad en el tamaño y actividad de la biomasa microbiana del suelo, la cual juega un papel importante en los ciclos biogeoquímicos (Tripathi *et al.*, 2006).

El contenido de arcilla en el suelo afectó la estructura y distribución de OTUs (Figura 8-7). La influencia de las características físicas del suelo sobre la diversidad microbiana no han sido abordadas de manera significativa, sin embargo, se sabe que las consideraciones físicas de escala del poro son importantes para comprender la dinámica espacial de la diversidad bacteriana (Metting, 1993). El trabajo de Chau *et al.* (2011) sobre el efecto de la textura del suelo en la riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas, presentó que la riqueza bacteriana aumentó significativamente ($p=0,04$) con el grosor del suelo, y esto se justifica mediante la teoría de que el aumento del número de películas de agua aisladas se mantienen en las esquinas de los poros, por lo tanto, en suelo con poros más grandes aumentan las posibilidad de favorecer la diversidad microbiana (Zhou *et al.*, 2002). Por otro lado, la fracción de arcilla del suelo tiene una comunidad bacteriana más diversa que las fracciones de limo o arena (Sessitsch *et al.*, 2001). En la mayoría de suelos, las arcillas (y limos) determinan la capacidad de retención de agua, además, proporcionan sitios de unión para el carbono orgánico y oligoelementos requeridos por las bacterias, también proveen protección contra la desecación, la difusión de gases, compuestos tóxicos y la depredación por protozoos (Ranjard & Richaume, 2001).

El carbono orgánico fue el tercer parámetro fisicoquímico que afectó la distribución de OTUs a través de los sitios muestreados (Figura 8-7). Se ha encontrado que la distribución heterogénea de los microorganismos del suelo está determinada principalmente por la estructura del suelo, la porosidad y el contenido de carbono orgánico (Ranjard *et al.*, 2010).

En resumen, estos resultados demuestran que las variables fisicoquímicas del suelo salinidad, arcilla y carbono orgánico, afectaron la composición de OTUs en la comunidad microbiana encontrada. Esto concuerda con los resultados de Jeanbille *et al.* (2016), en los cuales presentaron que la alfa diversidad procariota presente en sedimento costero mostró asociación significativa con la salinidad, temperatura y contenido de carbono orgánico.

8.7 Estructura de la Comunidad de Bacterias y Archaeas.

Con el fin de identificar abundancias de los grupos taxonómicos en los puntos de muestreo, se realizó un gráfico de barras de abundancias relativas de bacteria y archaea a nivel de filo (Figura 8-8). Se presentó una mayor abundancia en los grupos de *Proteobacteria* (37,6-45,2%), *Actinobacteria* (4,1-14,98%), *Bacteroidetes* (3,3-12,2%), *Planctomycetes* (3,4-9,2%), *Chloroflexi* (3,9-6,6%), *Gemmatimonadetes* (2,5-6,4%), *Acidobacteria* (3,3-5,7%), *Firmicutes* (0,9-5,2%). Los siguientes grupos menos representados fueron *Nitrospirae* (0,1-4,5%), *Chlamydiae* (0,5-1,7%), *Candidate division* (0,1-1,0%) y *Euryarchaeota* (archaea) (0-0,11%). Los principales filos más abundantes encontrados en este trabajo corresponden a los reportados por otros autores, aunque algunos filos pueden diferir en la proporción (Anexo B).

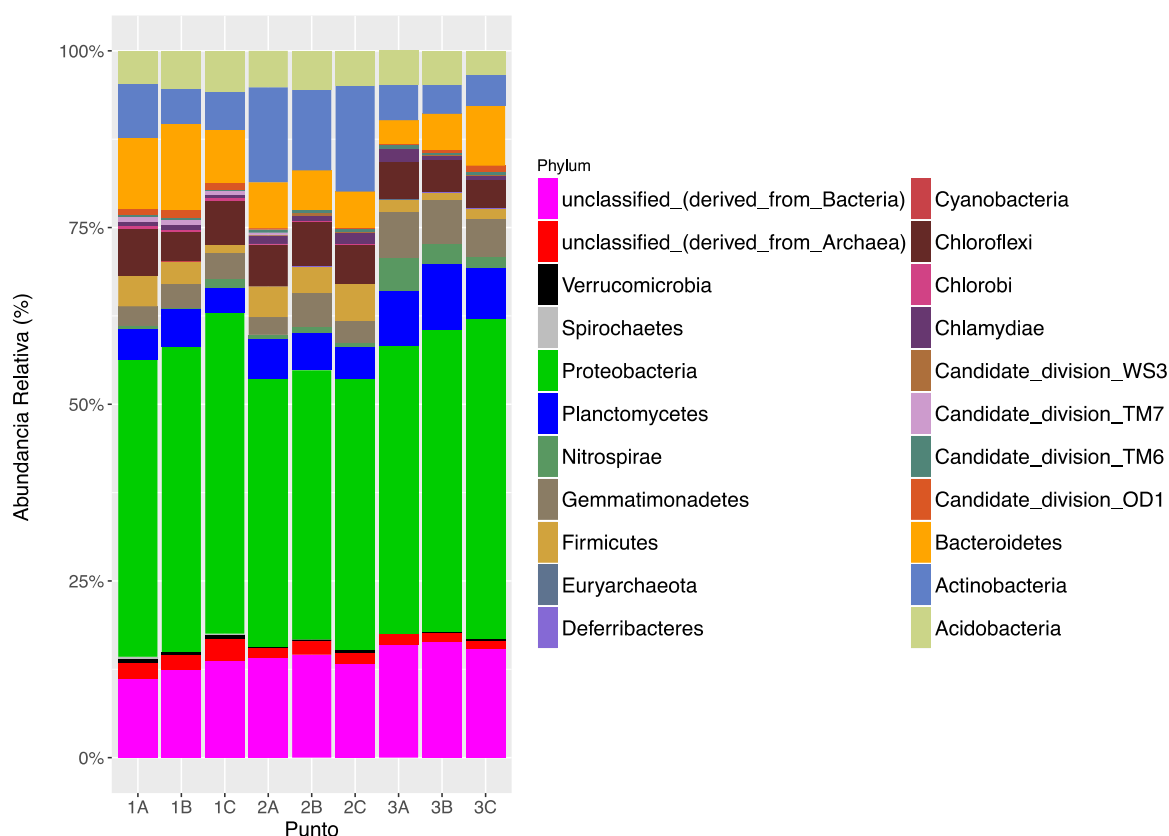


Figura 8-8: Abundancias relativas a nivel de *Phylum* (filo) de las taxas más abundantes de Bacterias y Archaeas en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).

El filo *Proteobacteria* presentó la mayor abundancia relativa en todos los niveles de salinidad, con valores de 37,6 a 45,2%, lo cual es similar a lo observado en otros trabajos de diversidad en suelos de manglar en los cuales *Proteobacteria* fue el filo más abundante (Alzubaidy *et al.*, 2016; Basak *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; Nogueira *et al.*, 2015; Ligi *et al.*, 2014; Mendes & Tsai, 2014; Jiang *et al.*, 2013; Andreote *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 2010). Por ejemplo, en el trabajo de Andreote *et al.* (2012) las abundancias de *Proteobacterias* fueron del 47,1% al 22,7%, y en el trabajo de Ligi *et al.* (2014) las abundancias fueron de 22,7 al 59,2% (Anexo B). Este filo ha sido reportando como el más abundante en estudios de diversidad en suelo (Janssen, 2006). *Proteobacteria* es el *phylum* perteneciente al dominio bacteria que posee la mayor diversidad filogenética y metabólica, su divisiones fueron establecidas por Garrity *et al.* (2006) mediante análisis de secuencias del gen 16S rRNA (Emerson *et al.*, 2007; McAllister *et al.*, 2011). Varios representantes de este filo son ecológicamente importantes debido a que juegan un papel

primordial en los ciclos del carbono, azufre y nitrógeno en nuestro planeta (Dworkin, 2006).

Actinobacteria fue el filo que presentó el segundo lugar de mayores abundancias relativas, después de *Proteobacteria*, siendo del 4,1 al 14,9%; sin embargo, en el trabajo de Andreote *et al.* (2012) *Actinobacteria* obtuvo el tercer lugar en abundancias relativas (5,4–12,2%), siendo *Firmicutes* el segundo filo con mayor abundancia en ese trabajo (10,5–13,8%). Ligi *et al.* (2014) reportó a *Actinobacteria* con abundancias entre 2,0–27,8%, las cuales son menores con respecto a nuestros resultados (Anexo B). El *phylum Actinobacteria* es uno de los más grandes grupos del dominio Bacteria, son Gram positivas, filamentosas, se encuentran tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, especialmente en suelo donde juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica (Ventura *et al.*, 2007; Goodfellow & Williams; 1983). Las *Actinobacterias* pueden estar presentes en suelos (por ejemplo, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, y especies de *Salinispora*) pueden ser simbiontes de plantas (por ejemplo, *Frankia spp.*), patógenos de plantas o animales (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* o especies de *Nocardia*) o comensales gastrointestinales (por ejemplo, *Bifidobacterium spp.*) (Barka *et al.*, 2016).

Dentro de los filos menos representados, *Nitrospirae* se presentó en una proporción de 0,1 a 4,5%, este filo está conformado por una única familia llamada *Nitrospiraceae*, compuesta a su vez por géneros oxidadores de nitrito a nitrato (*Nitrospira*), oxidadores de Fe^{2+} a Fe^{3+} (*Leptospirillum*) y organismos que usan sulfato como aceptor de electrones (*Thermodesulfobrio*) (Daims, 2015). Por lo tanto, debido al importante papel de este filo en el ciclo del nitrógeno, la presencia de *Nitrospirae* en la rizósfera de *A. germinans* puede estar jugando un rol esencial en la incorporación de nitrógeno a la planta en la condición de alta salinidad.

La presencia del filo *Deferribacteres* se encontró con una abundancia relativa baja de 0,1 a 0,2% en las muestras. Nogueira *et al.* (2015) encontraron una dominancia del filo *Deferribacteres* en sedimentos de marismas, fuera del área de manglar (Nogueira *et al.*, 2015). Los hábitats de la mayoría de *Deferribacteres* son nichos marinos e hídricos reductores de hierro, en condiciones termofílicas, halofílicas y ricos en sulfuros; su

metabolismo es versátil al ser heterótrofos anaerobios estrictos y quimiolitótrofos (Alauzet & Jumas-Bilak, 2014; Takiki *et al.*, 2010).

En la Figura 8-8 también se puede observar varios filos denominados "*Candidate divisions*", los cuales representan divisiones bacterianas que han sido caracterizadas a partir de secuencias ambientales y no son representados por organismos cultivados, de esta manera, el término *Candidate divisions* indican su estado como nuevas divisiones bacterianas (Hugenholtz *et al.*, 1998). Estos grupos han sido poco estudiados y existe escasa información sobre su ecología y capacidad metabólica. Por ejemplo, miembros de *Candidate division OD1* han sido detectados principalmente en ambientes anóxicos ricos en azufre y ambientes con altas concentraciones de metano (Peura *et al.*, 2012).

A nivel de dominio, Bacteria fue más abundante que archaea en todos los niveles de salinidad (Figura 8-8). La abundancia relativa total del dominio archaea fue de 0 a 0,11%, lo cual está dentro del rango de las abundancias encontradas por Andreote *et al.* (2012) en suelo de manglar mediante metagenómica, las cuales fueron de 0 al 3,4%. Los *phylums* identificados de archaea fueron *Euryarchaeota* (0,01-0,11%) y *Crenarchaeota* (0-0,004%), adicionalmente, se categorizaron secuencias como "no clasificadas derivadas de archaeas" (1,24 a 3,04%). El filo dominante encontrado dentro del dominio archaea fue *Euryarchaeota*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Li *et al.* (2016), Bhattacharyya *et al.* (2015) y Mendes *et al.* (2012) en los cuales realizaron el análisis de la diversidad de archaeas mediante secuenciación del gen 16S rRNA. *Euryarchaeota* es uno de los cuatro filos del dominio archaea, el cual comprende un grupo fisiológicamente diverso conformado por metanógenos, halófilos extremos e hipertermófilos y algunos productores de metano como parte de su metabolismo (Amils, 2011).

8.7.1 Estructura de la comunidad de Bacterias: *Proteobacteria*.

➤ Estructura de la comunidad de *Proteobacteria* a nivel de clase.

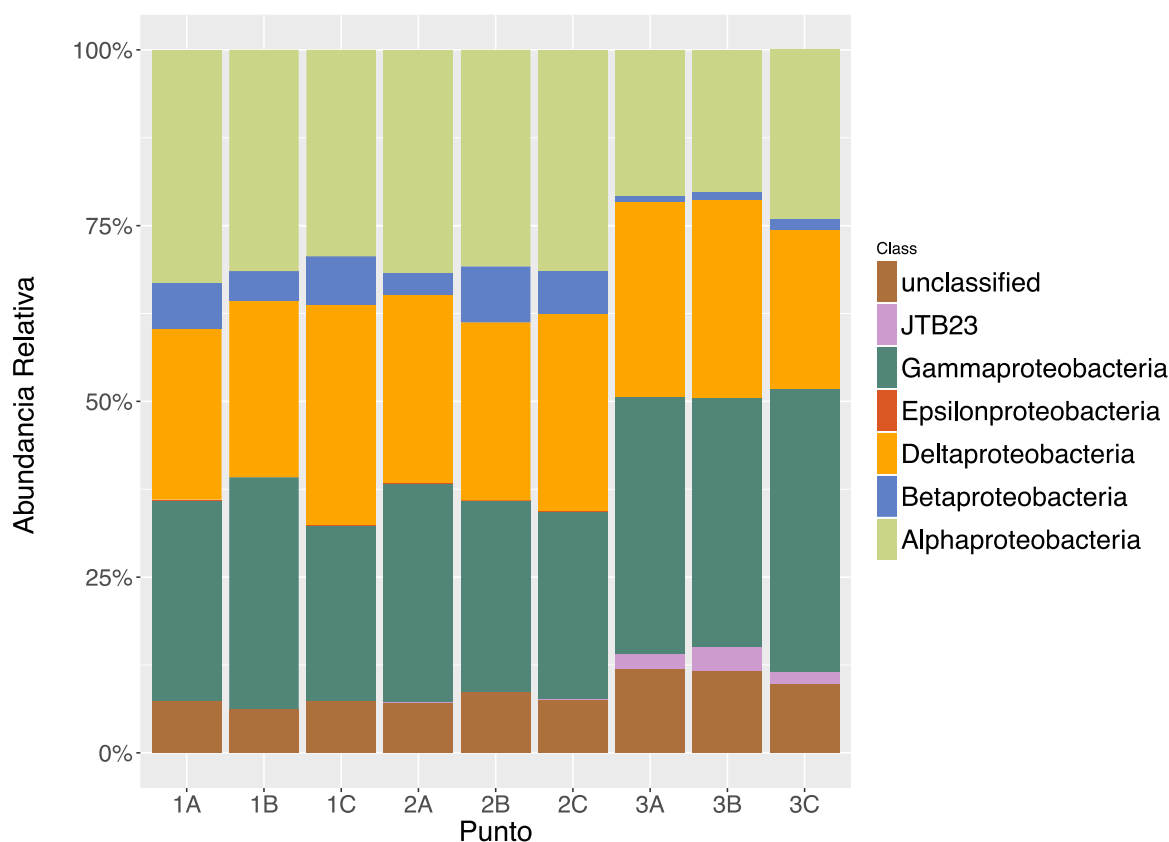


Figura 8-9: Abundancias relativas a nivel de clase dentro del filo *Proteobacteria* en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).

La figura 8-9 permite observar los principales grupos microbianos a nivel de clase encontrados en el filo *Proteobacteria*, compuesto por *Alfaproteobacteria* (Rango entre 20,1-33,1%), *Betaproteobacteria* (0,9-7,9%), *Deltaproteobacteria* (22,7-31,2%), *Gammaproteobacteria* (24,9-40,2%) y *Epsilonproteobacteria* (0,01-0,12%). La clase *Alfaproteobacteria* está conformada por una gran diversidad de organismos celulares, y en general poseen una inmensa variedad de estrategias metabólicas que incluyen la fotosíntesis, fijación de nitrógeno, oxidación de amonio y metilotropía (Williams *et al.*, 2007). *Alfaproteobacteria* ha sido reportado en suelos de manglar como uno de los

grupos más abundantes, e involucrados en la degradación de celulosa (Soares *et al.*, 2013).

También se encontró, en una proporción importante, la clase JTB23 (0,06-3,5%) observada de forma más destacada en el punto 3 de salinidad alta. JTB23 ha sido identificada en estudios de comunidades microbianas de sedimentos de las profundidades del mar Mediterráneo y del Océano Pacífico (Burgsdorf *et al.*, 2015). Asimismo, fue identificada como parte de la comunidad microbiana presente en la corteza de la esponja marina *Petrosa ficiformis* (Kouridaki *et al.*, 2010).

➤ **Estructura de la comunidad de *Alfaproteobacteria* a nivel de orden.**

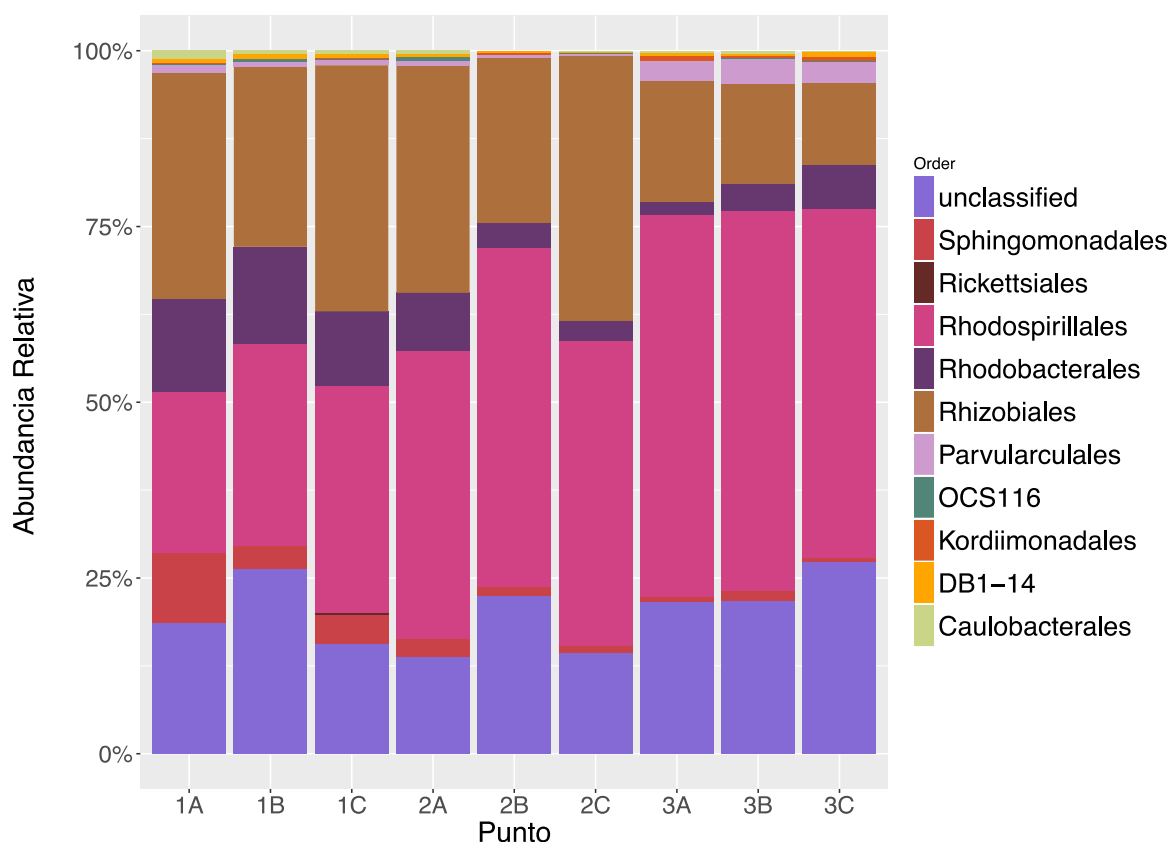


Figura 8-10: Abundancias relativas a nivel de orden dentro de la clase *Alfaproteobacteria* en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).

La figura 8-10 presenta las abundancias relativas de los órdenes más representativos dentro de la clase *Alfa-proteobacteria*, conformados por *Rhodospirillales* (28,6-54,4% a lo largo de todas las muestras), no-clasificado (14,3-27,2%), *Rhizobiales* (14,3-37,5%), *Rhodobacterales* (1,75-13,7%); los órdenes menos representados fueron *Sphingomonadales* (0,6-9,9%), *Caulobacterales* (0,2-1,1%) y *Parvularculales* (0,3-3,4%).

El orden *Rhodospirillales* o "bacterias púrpuras" de la clase *Alphaproteobacteria* hace parte de las bacterias fototróficas anoxigénicas y se caracterizan por realizar fotosíntesis con una bacterioclorofila (bchl) bajo condiciones anaeróbicas. Especies de *Rhodospirillales* han sido reportados en un amplio rango de hábitats tales como tejidos vegetales, ambientes acuáticos, suelos salinos, sitios contaminados con petróleo, entre otros (Baldani *et al.*, 2014; Starr *et al.*, 2013).

El orden *Rhizobiales* (Figura 8-10) es conocido por su asociación simbiótica con plantas, de igual forma, se ha reportado su asociación con plantas de mangle al presentarse de manera más abundante en suelo rizosférico de manglar que en suelo no rizosférico (Gomes *et al.*, 2011). Del orden *Parvularcula* algunas de sus especies han sido aisladas del mar Sargasso, y la especie cultivable *Parvularcula lutaonensis* ha sido aislada de una fuente termal costera (Oh *et al.*, 2011).

Cepas del orden *Sphingomonadales* han sido aisladas de diversos ambientes, incluyendo suelos contaminados con químicos, sedimentos, agua de río, agua de mar, fuentes termales, hospitales y algunas especies encontradas en asociación a enfermedades de hospederos vegetales y humanos. Lo anterior refleja la diversidad de adaptación fisiológica que puede tener este grupo bacteriano (Figura 8-10) (Garrity *et al.*, 2006).

➤ **Estructura de la comunidad de *Betaproteobacteria* a nivel de orden.**

Dentro de la clase *Beta-proteobacteria*, los órdenes con mayor abundancia encontrados fueron TRA3-20 (30,6-94,9%), *Nitrosomonadales* (1,1-30,6%), no-clasificados (2,2-22,4%), *Burkholderiales* (0,6-14,3%); y los órdenes con menor abundancia fueron *Hydrogenophilales* (0,2-4,2%), *Rhodocyclales* (0,42-3,39%) y *Methylophilales* (0,5-3,6%) (Figura 8-11).

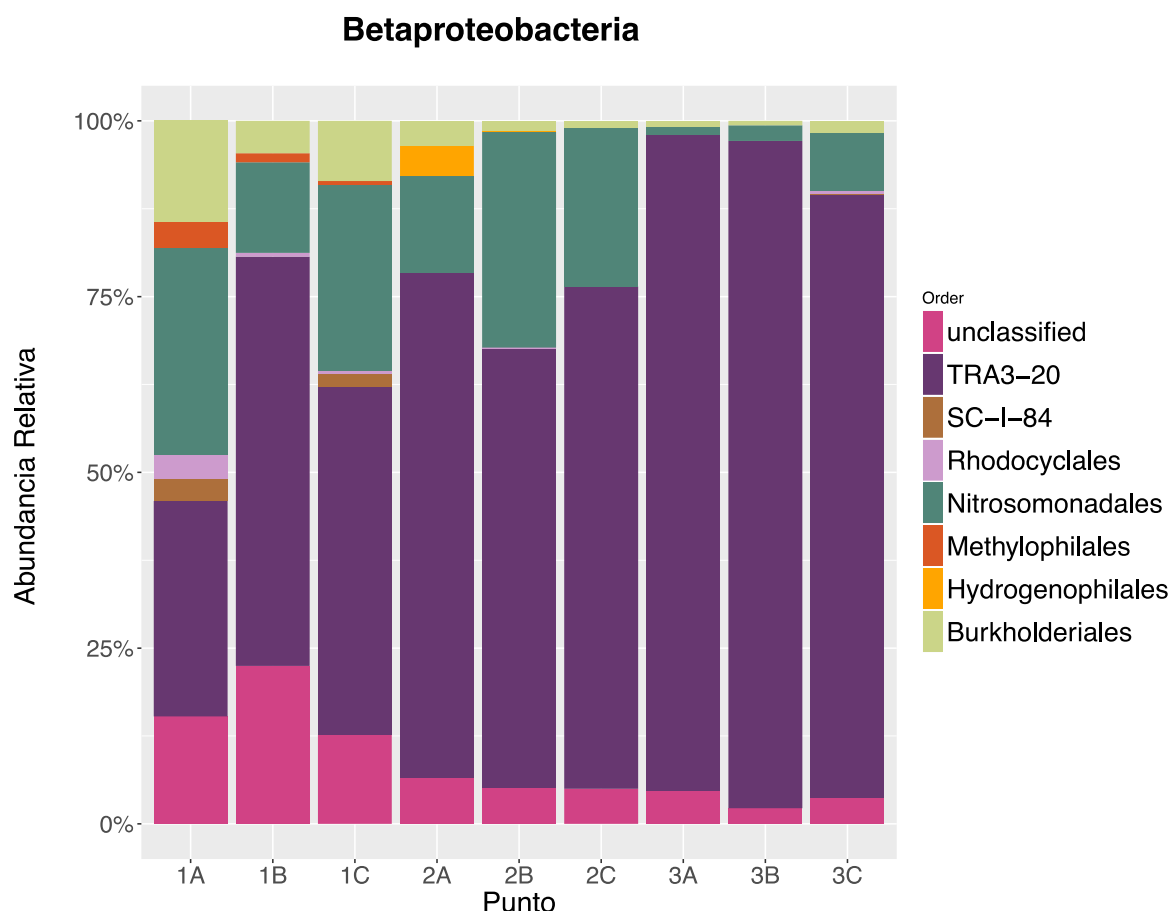


Figura 8-11: Abundancias relativas a nivel de orden dentro de la clase *Betaproteobacteria* en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).

En un estudio de la diversidad microbiana en la rizósfera de tres especies de *Taxus* (*media*, *cuspidata* y *mairei*), los principales órdenes de *Betaproteobacteria* encontrados fueron *Burkholderiales* y *Nitrosomonadales* y TRA3-20, lo cual concuerda con los principales grupos encontrados en este trabajo (Da Cheng Hao *et al.*, 2016). El orden de *Betaproteobacteria* más abundante, TRA3-20, fue reportado en suelos contaminados con metales pesados mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA (Gołębiewski *et al.*, 2014). Organismos pertenecientes al orden *Nitrosomonadales* se encuentran en ambientes terrestres y acuáticos, los cuales son salinos, con altas concentraciones de amonio y altos rangos de pH, su importancia radica en la participación de sus miembros en procesos de nitrificación (Ward *et al.*, 2011). En el trabajo realizado por Alzubaidy *et al.* (2015) en suelos de manglar, la diversidad de *Betaproteobacteria* presentó una mayor

abundancia del orden *Burkholderiales* con respecto a nuestro trabajo; este orden comprende bacterias fenotípicamente, metabólicamente y ecológicamente diversas, bacterias aerobias estrictas y anaerobias facultativas, fijadores de nitrógeno y patógenos de plantas, animales y humanos (Garrity *et al.*, 2006).

➤ **Estructura de la comunidad de *Gammaproteobacteria* a nivel de orden.**

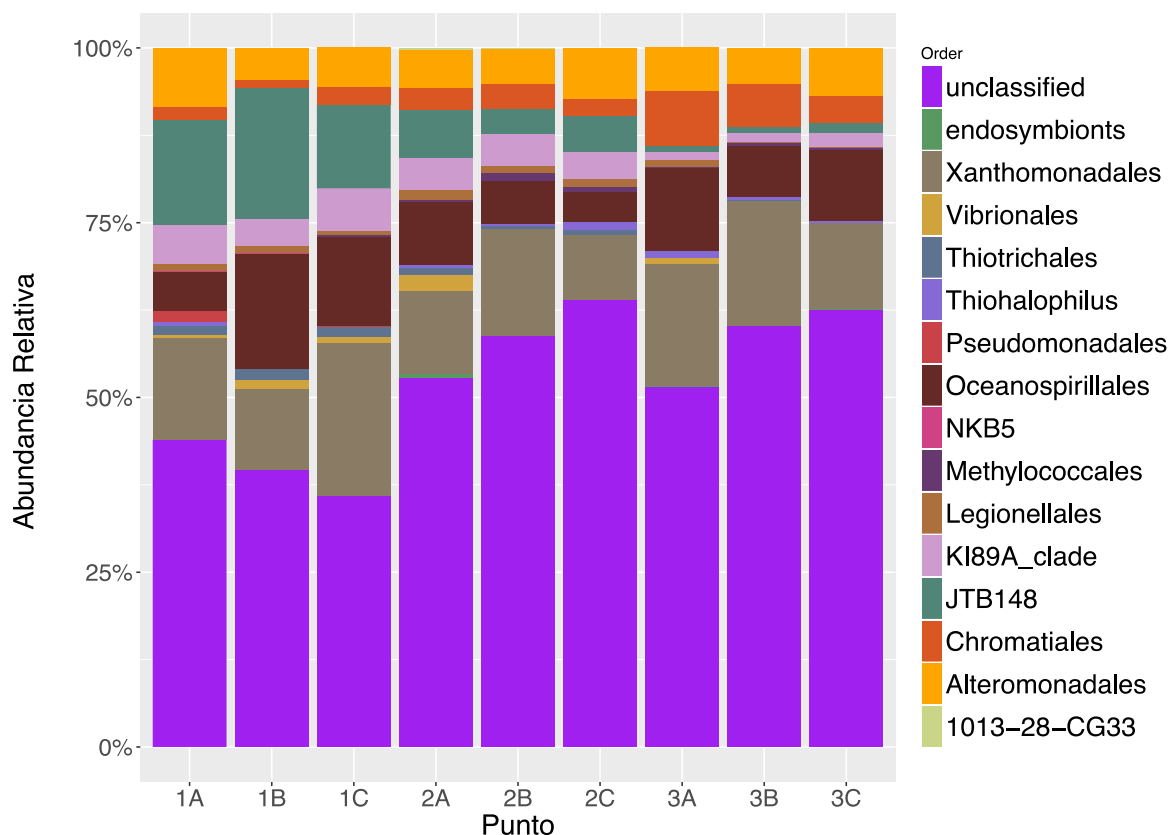


Figura 8-12: Abundancias relativas a nivel de orden dentro de la clase *Gammaproteobacteria* en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).

Los órdenes encontrados en mayor abundancia dentro de la clase *Gammaproteobacteria* fueron no-clasificados (35,8-63,9% a lo largo de todas las muestras), *Xanthomonadales* (9,1-21,8%), *Oceanospirillales* (4,3-16,3%), JTB148 (0,7-18,6%), *Alteromonadales* (4,4-8,3%) y *Chromatiales* (1,26-7,8%); los grupos menos abundantes fueron KI89A-clade (1,1-6,1%), *Vibrionales* (0,3-2,1%) y *Pseudomonadales* (0,2-1,5%) (Figura 8-12).

El orden con mayor abundancia en la clase *Gammaproteobacteria* fue *Xanthomonadales*, este comprende organismos con características fenotípicas bioquímicas diversas, siendo algunos miembros los mayores patógenos de plantas que han causado pérdidas económicas de impacto en la agricultura; por ejemplo, miembros de los género *Xylella* y *Xanthomonas*, son mayormente fitopatógenos que causan enfermedades en cultivos de tomate, banano, cítricos, arroz y café (da Silva *et al.*, 2002; Naushad *et al.*, 2015; Ryan *et al.*, 2011). El orden *Oceanospirillales* comprende en su mayoría géneros halotolerantes y halofílicos, aerobios, microaerofílicos o anaerobios facultativos (Garritty *et al.*, 2005). Miembros de este orden han sido asociadas con derrames de hidrocarburos y participan en interacciones simbióticas con varios invertebrados marinos, incluyendo erizos de mar, corales, mejillones y gusanos carnívoros (Hazen *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2012; Verna *et al.*, 2010).

8.7.2 Estructura de la Comunidad de Archaeas: *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*.

La asignación taxonómica en archaeas, permitió identificar los dos filos *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*. En la tabla 8-3 se presentan las abundancias de OTUs en los dos filos identificados de archaea.

Tabla 8-3: Distribución de OTUs en filos de archaea.

Filo	No. de OTUs	Porcentaje (%)
<i>Euryarchaeota</i>	294	98
<i>Crenarchaeota</i>	6	2
Total	300	100

Dentro de los filos de archaea con asignación taxonómica, las abundancias fueron *Crenarchaeota* (0-7,31%) y *Euryarchaeota* (92,68-100%) (Figura 8-13).

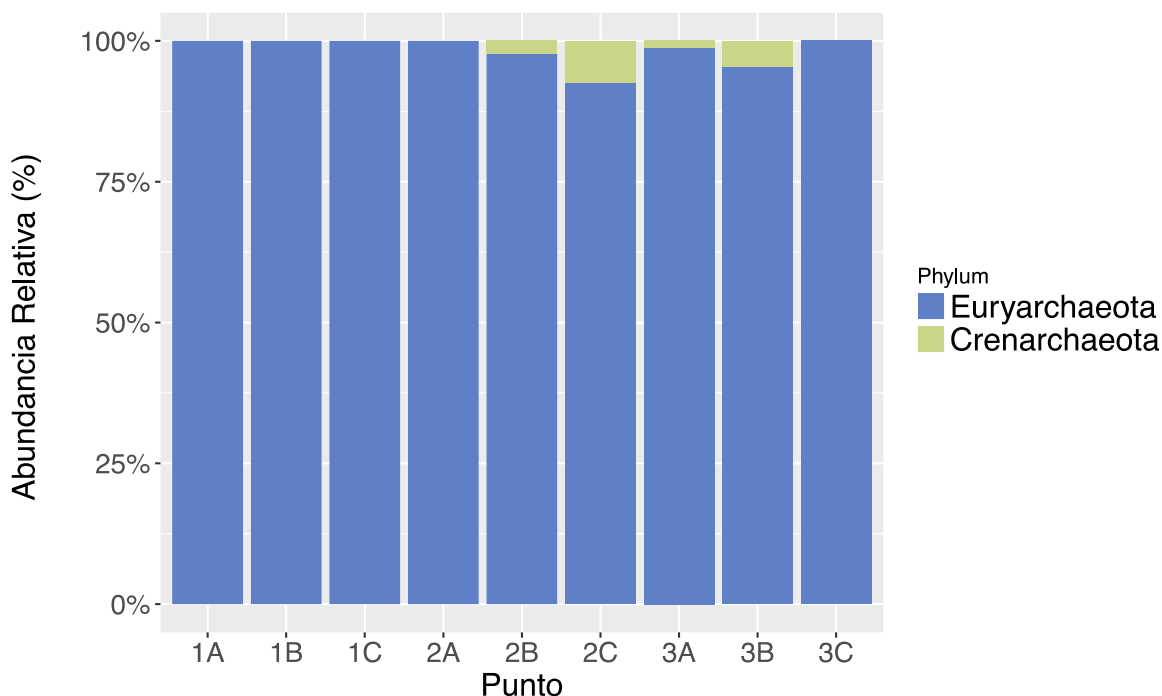


Figura 8-13: Abundancias relativas a nivel de *phylum* en archaea en muestras de salinidad baja (1A, 1B y 1C), salinidad media o moderada (2A, 2B y 2C), salinidad alta (3A, 3B y 3C).

Aunque difieren en sus proporciones, los principales filos encontrados en este trabajo corresponden con los reportados por Xie *et al.* (2014) en suelos, en dicho trabajo, los filos predominantes fueron *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* con proporciones del 51,2% y 48,8%. Por el contrario, en trabajo de Bhattacharyya *et al.* (2015) en suelos de manglar, los filos predominantes fueron *Euryarchaeota* y *Thaumarchaeota*.

El filo *Euryarchaeota* puede ser Gram positiva o Gram negativa (Garrity *et al.*, 2005). El filo *Crenarchaeota* se caracteriza porque todos sus miembros son extremadamente termofílicos, han sido aislados de respiradores térmicos, fuentes termales y otros ambientes térmicos (Oren & Papke, 2010; Prokofeva *et al.*, 2009).

La tabla 8-4 presenta los valores promedios y los errores estándares de las lecturas asignadas a archaea, a lo largo del gradiente de salinidad. No se encontraron diferencias significativas en las lecturas de archaea en los niveles de salinidad.

Tabla 8-4: Valores promedios de lecturas asignadas a categorías taxonómicas de archaea, en los diferentes niveles de salinidad.

Zona de muestreo	Promedios de lecturas	Error estándar
Salinidad baja n= 3	17,66	6,50
Salinidad media n= 3	42,00	1,00
Salinidad Alta n= 3	40,33	33,50
P (Tukey HSD)	ns	-

n=número de réplicas. Letras diferentes en cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas, según análisis de comparaciones múltiples de Tukey. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: $p > 0,05$ o no significativo.

➤ Archaea en otros niveles taxonómicos.

La tabla 8-5 presenta los grupos microbianos encontrados en diferentes categorías taxonómicas de archaea. En cada categoría se identificó un solo representante, siendo *Euryarchaeota* el filo con mayor resolución hasta nivel de familia. Sin embargo, del filo *Crenarchaeota* se identificó en menor resolución, llegando hasta nivel de clase.

Tabla 8-5: Grupos microbianos encontrados en diferentes categorías taxonómicas de archaea en todos los niveles de salinidad. En paréntesis el número de lecturas totales asignadas a cada categoría.

Filo	Clase	Orden	Familia	Género
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Halobacteria</i> (3)	<i>Halobacteriales</i> (3)	<i>Halobacteriaceae</i> (3)	-
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Thermoprotei</i> (2)	-	-	-

La clase *Thermoprotei* se caracteriza porque sus miembros son organismos termófilos, dependientes de azufre, autótrofos y pueden crecer a temperaturas de hasta 95 °C (Slonczewski & Foster, 2013). La clase halobacteria consiste en bacterias halófilas que

requieren alta concentraciones de sales para su crecimiento, en un rango de 1,5 a 5,2 M de NaCl (Goldman & Green, 2015).

8.7.3 Comparación de la Composición Bacteriana a lo largo del Gradiente de Salinidad.

➤ *Phylums* bacterianos con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.

Se identificaron 25 grupos taxonómicos a nivel de phylum con diferencias significativas en la proporción de lecturas a lo largo del gradiente de salinidad (Anexo C, tabla C-1), se graficaron los siguientes nueve filos con mayor número de lecturas: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, SBR1093, OD1, BRC1 y *Verrucomicrobia* (Figura 8-14). En los niveles de salinidad alta, filos con mayor proporción de secuencias fueron: *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes* y SBR1093.

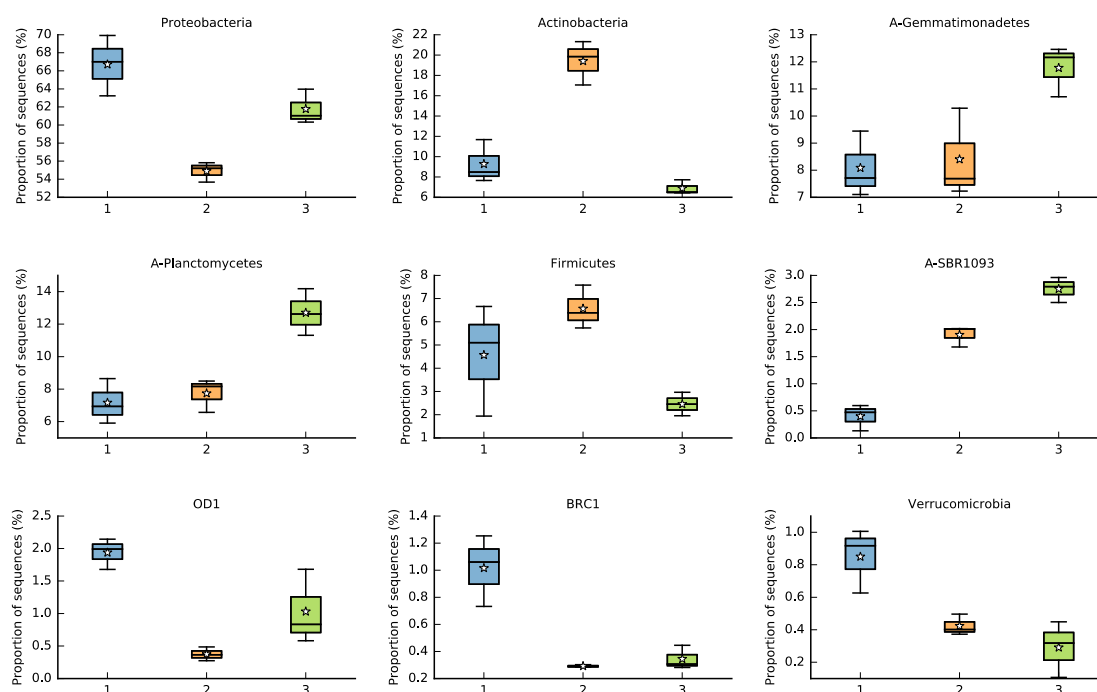


Figura 8-14: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de los filos que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).

El filo *Gemmatimonadetes* ha sido definido por análisis de comparación de secuencias del gen 16S rRNA, de cepas aisladas y representantes no cultivables a partir de hábitats terrestres y acuáticos (Hanada & Sekiguchi, 2014). *Gemmatimonadetes* es frecuentemente detectado en muestras ambientales mediante identificación 16S rRNA, se encuentra entre los primeros nueve filos en suelos y comprende alrededor del 2% de las comunidades de bacterias del suelo (DeBruyn *et al.*, 2011; Janssen, 2006).

El filo *Planctomycetes* es un filo bacteriano con múltiples características morfológicas, estructurales, metabólicas y genómicas (Fuerst, 2006). La mayoría de los aislamientos de este filo, son a partir de ambientes acuáticos marinos y de agua dulce; adicionalmente, la identificación basada en el gen 16S rRNA ha permitido encontrar a *Planctomycetes* diferentes, como por ejemplo, hipertermofílicos, hipersalinos, anaeróbios, extremadamente ácidos y ambientes alcalinos (Dillon *et al.*, 2009; Heijs *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2006; Koschorreck *et al.*, 2010).

SBR1093 fue establecido como un filo candidato mediante la identificación del gen 16S rRNA a partir de lodo activado de un reactor para la eliminación de fosfato; además, mediante genómica comparativa se ha descubierto que este filo tiene una vía de fijación de carbono (Bond *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2014). El filo *Actinobacterias* presentó abundancias altas en el nivel de menor salinidad; este filo ha sido aislado a partir de suelos salinos y áridos en Rusia, y se ha identificado el aumento de la osmolaridad como su mecanismo de adaptación a estos ambientes (Lubsanova *et al.*, 2014).

➤ **Clases bacterianas con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.**

Se identificaron 75 grupos taxonómicos a nivel de clase con diferencias significativas en la proporción de secuencias a lo largo del gradiente de salinidad (Anexo C, tabla C-2), se graficaron las siguientes nueve clases con mayor proporción de secuencias: *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Acidobacteria*, *Phycisphaerae*, *Anaerolineae*, S085, *Betaproteobacteria* y *Actinobacteria* (Figura 8-15). En los niveles de salinidad alta, las clases con mayor proporción de secuencias fueron: *Gammaproteobacteria* y *Phycisphaerae*.

Gammaproteobacteria está formado por bacterias fotosintéticas púrpuras del azufre y algunos quimiolitótrofos en su mayoría oxidadores de hierro y azufre (Dworkin, 2006). *Phycisphaerae* es una de las clases de *Planctomycetes*, se han obtenidos cultivos puros a partir de suelo en Australia, y del alga marina *Porphyria sp.* en Japón (Davis *et al.*, 2005; Fukunaga *et al.*, 2009).

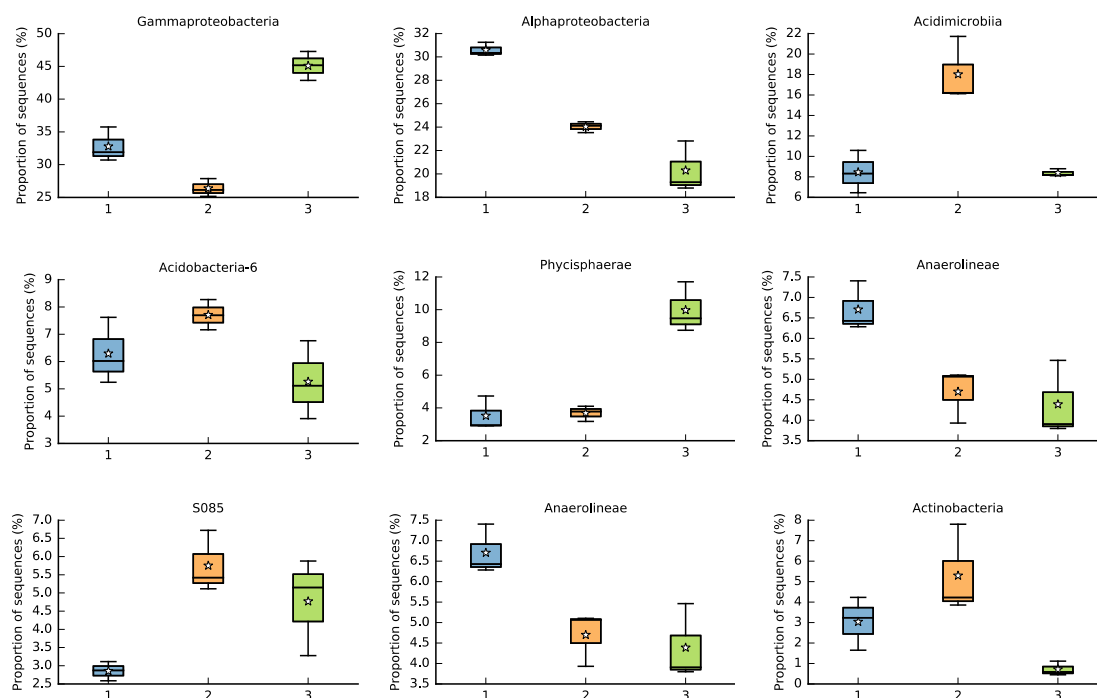


Figura 8-15: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de los grupos microbianos a nivel de clase que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).

➤ Órdenes bacterianos con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.

Se identificaron 90 grupos taxonómicos a nivel de orden con diferencias significativas en la proporción de secuencias a lo largo del gradiente de salinidad (Anexo C, tabla C-3), se graficaron los siguientes nueve órdenes con mayor proporción de secuencias: *Acidimicrobiales*, *Thiotrichales*, *Rhizobiales*, *Chromatiales*, *NB1-j*, *Phycisphaerales*, *Desulfuromonadales*, *iii1-15*, y *Actinomycetales* (Figura 8-16).

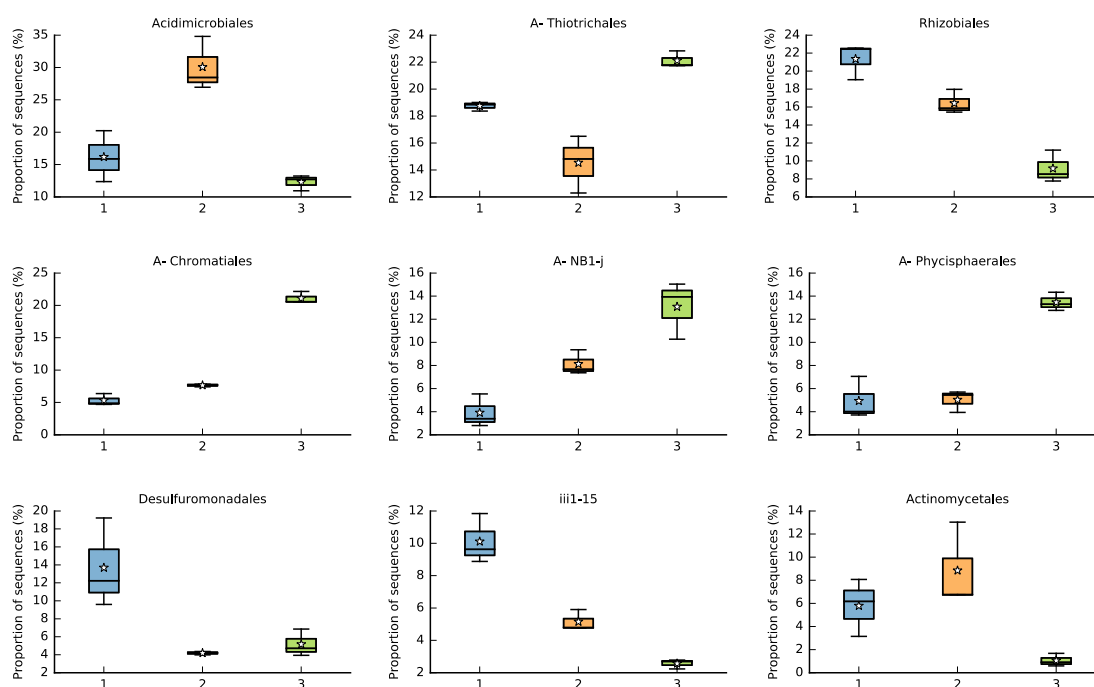


Figura 8-16: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de los grupos microbianos a nivel de orden que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).

Los siguientes órdenes presentaron una mayor proporción de secuencias en el nivel de alta salinidad: *Chromatiales*, *Thiotrichales*, NB1-j y *Phycisphaerales* (Figura 8-16). Del orden *Chromatiales*, han sido descritas bacterias fotótrofas anoxigénicas y haloalcalifílicos identificadas en lagos salinos con altas concentraciones de carbonatos (Sorokin *et al.*, 2014). *Thiotrichales* es un orden morfológicamente, metabólicamente y ecológicamente diverso (Garrity, 2006).

➤ Familias bacterianas con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.

Se identificaron 97 grupos taxonómicos a nivel de familia con diferencias significativas en la proporción de secuencias a lo largo del gradiente de salinidad (Anexo C, tabla C-4), se graficaron las siguientes nueve familias con mayor proporción de secuencias: *Piscirickettsiaceae*, koll13, *Ectothiorhodospiraceae*, *Hyphomicrobiaceae*, NB1-i,

Marinicellaceae, *Rhodobacteraceae*, *Flammeovirgaceae* y *Entotheonellaceae* (Figura 8-15).

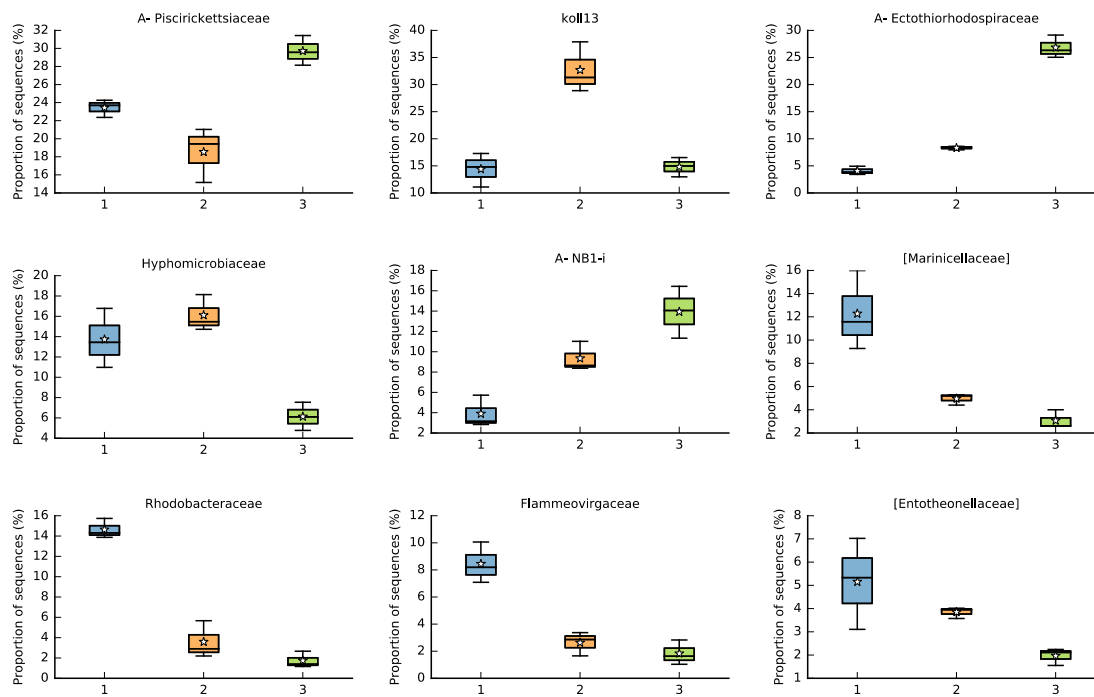


Figura 8-17: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de las familias que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).

Como se puede observar en la figura 8-17, las siguientes familias presentaron una mayor proporción de secuencias en el nivel de alta salinidad: *Piscirickettsiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, y NB1-i. La familia *Ectothiorhodospiraceae* representa bacterias halofílicas y alcalifílicas púrpuras del azufre (Imhoff, 2006). La familia *Piscirickettsiaceae* constituye bacterias aisladas principalmente de ambientes marinos (Brenner *et al.*, 2005).

➤ Géneros bacterianos con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.

Se identificaron 162 grupos taxonómicos a nivel de género con diferencias significativas en la proporción de secuencias a lo largo del gradiente de salinidad (Anexo C, tabla C-5), se graficaron los siguientes nueve géneros con mayor proporción de lecturas:

Rhodoplanes, *Thioalkalivibrio*, *Roseospirillum*, *Oceanibaculum*, *Nitrospira*, *Rhodovibrio*, *Desulfuromonas*, *Methylosinus* y *Thalassobacillus* (Figura 8-18).

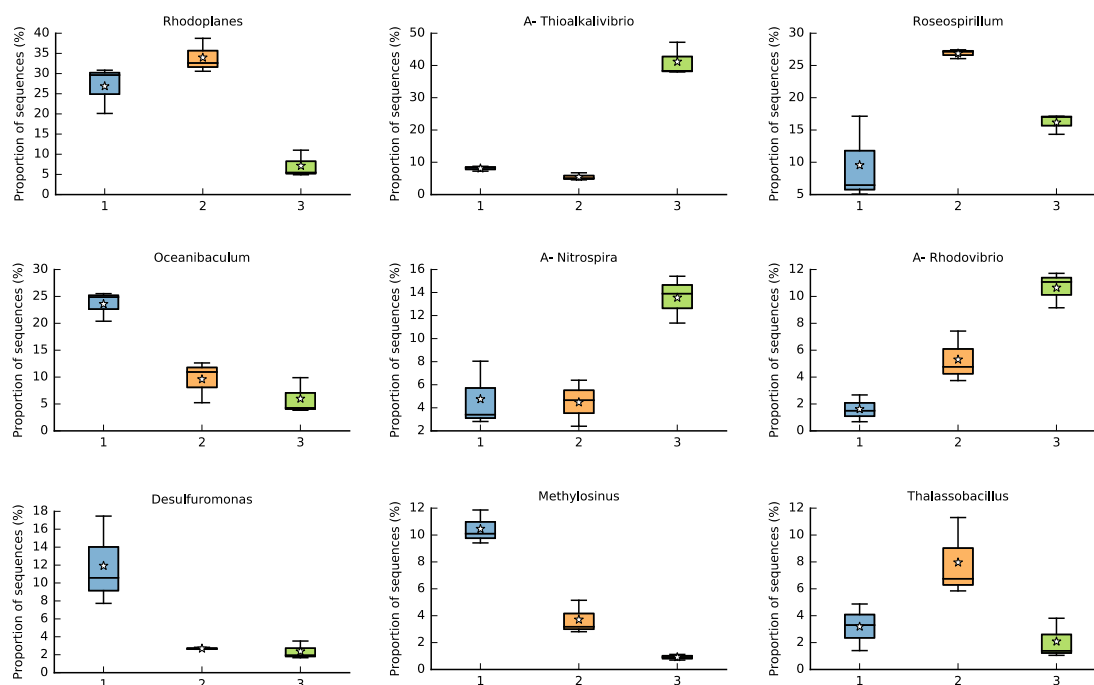


Figura 8-18: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de los géneros que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).

Como se puede observar en la figura 8-16, los siguientes géneros presentaron una mayor proporción de lecturas en el nivel de alta salinidad: *Thioalkalivibrio*, *Nitrospira* y *Rhodovibrio*.

El género *Thioalkalivibrio* hace parte de la familia *Ectothiorhodospiraceae*, del filo *Gammaproteobacteria*; este género es un quimiolitotrofo obligado que oxida sulfido, tiosulfato, azufre y tetratiónato y fija CO₂ en la vía del ciclo de Calvin. El sodio es requerido para su crecimiento, y muchas especies son extremadamente halotolerantes y alcalifílicas (Oren, 2014).

La familia *Nitrospira* hace parte del filo *Nitrospirae* representa el grupo más diverso conocido de bacterias oxidadoras de nitrito (NOB, por su siglas en inglés), se han encontrado en hábitats terrestres, agua de mar, sedimentos de la profundidad del mar,

tejido de esponja, fuentes geotérmicas, sistemas de distribución de agua potable, tuberías de hierro corroídas y plantas de tratamiento de agua residual (Daims *et al.*, 2015).

El género *Rhodovibrio* perteneciente al filo *Alfaproteobacteria*, crece preferencialmente fotoheterotróficamente bajo condiciones anóxicas y de luz; además, son bacterias halófilas que requieren NaCl o sal de mar para crecer, su hábitat consiste en zonas anóxicas de ambientes hipersalinos (Garrrity, 2006).

➤ **Especies bacterianas con diferencias significativas en el gradiente de salinidad.**

Se identificaron 161 grupos taxonómicos a nivel de especie con diferencias significativas en la proporción de secuencias a lo largo del gradiente de salinidad (Anexo C, tabla C-6), de los cuales se graficaron las siguientes nueve especies con mayor proporción de lecturas (*Roseospirillum parvum*, *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans*, *Oceanibaculum indicum*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrospira calida*, *Thioalkalivibrio sulfidophilus*, *Nitriliruptor alkaliphilus*, *Methylosinus sporium* y *Desulfuromonas michiganensis*). Como se puede observar en la figura 8-19, las especies que presentaron una mayor proporción de lecturas en el nivel de alta salinidad fueron *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans*, *Nitrospira calida* y *Thioalkalivibrio sulfidophilus*.

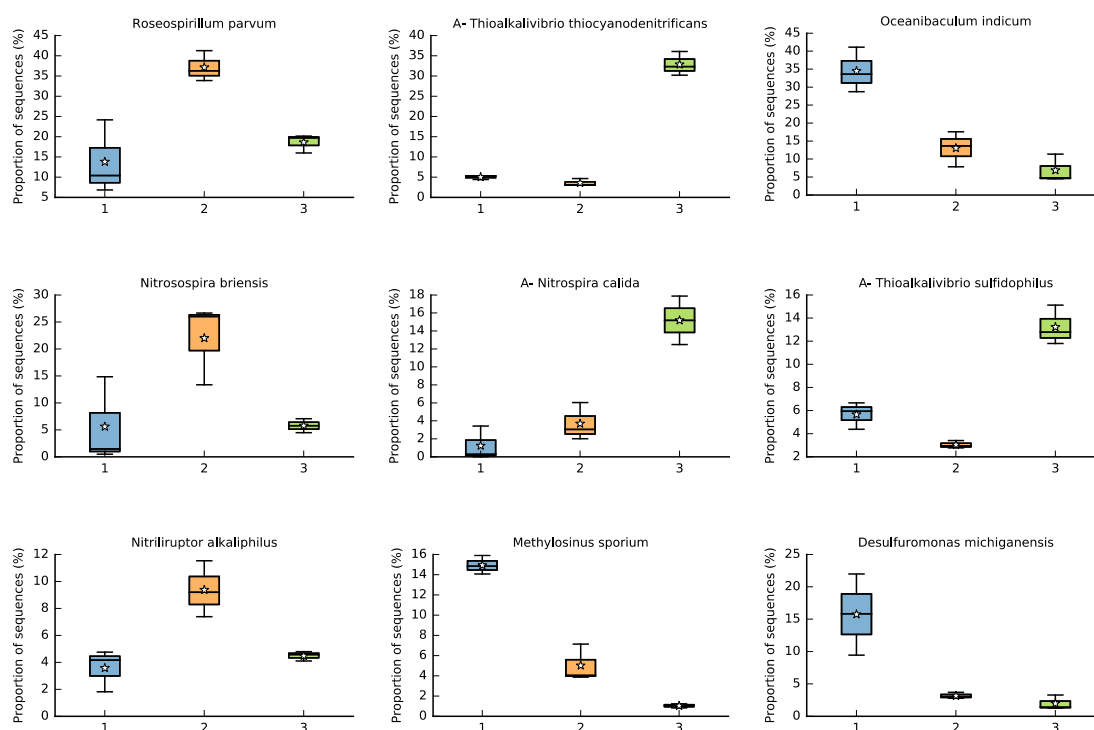


Figura 8-19: Diagramas de caja muestran las diferencias en la abundancia relativa de las especies que presentaron las más altas diferencias significativas entre los niveles de salinidad baja (1), salinidad media (2) y salinidad alta (3).

La especie bacteriana *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans*, perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria*, del orden *Chromatiales* y de la familia *Ectothiorhodospiraceae*, es Gram negativa, haloalcalifílica, oxidadora del azufre, su rango óptimo de temperatura es de 33 a 35 °C, rango óptimo de pH es de 8,0 a 10,3 y rango de salinidad de 0,3 a 2 M Na⁺ (Sorokin *et al.*, 2004). Por lo tanto, las características ambientales requeridas por este microorganismo son suministradas por el manglar del Brazo Riíto en La Guajira (Tabla 8-1). Su fuente de energía proviene de la oxidación de una variedad de componentes inorgánicos del azufre, que incluyen sulfido, tiosulfato, tiocianato, polisulfido, azufre elemental y tetratiocianato. *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* ha sido aislada a partir de lagos de soda, los cuales se forman en zonas áridas donde el agua subterránea rica en CO₂ y bicarbonato, pero pobre en calcio y magnesio, se acumula en cuencas y se evapora, el sistema resultante tiene un pH estable alto (de 9 a 11) y con salinidad moderada a extremadamente alta (Berben *et al.*, 2015; Grant, 2006).

Nitrospira calida es una especie bacteriana oxidadora de nitrito (NOB) termofílica, aislada de la fuente termal Gorjachinsk en el área del lago Baikal de Rusia, la cual crece a la temperatura óptima de 46-52°C (Lebedeva *et al.*, 2011).

Thioalkalivibrio sulfidophilus pertenece al filo *Gammaproteobacteria*, es un quimiolitotrofo obligado, haloalcalifílico, bacteria oxidadora de azufre (SOB), usa CO₂ como única fuente de carbono y componentes inorgánicos de azufre como única fuente de energía (Muyzer *et al.*, 2011).

8.7.4 Análisis de la Abundancia Diferencial de OTUs al nivel de mayor resolución taxonómica posible.

Se realizó un análisis comparativo basado en los OTUs con mayor varianza a lo largo de los tres niveles de salinidad (Figura 8-20). En la figura, el color amarillo indica conteos cercanos a cero y el color azul indica los máximos valores de conteos. El eje x muestra nombres de muestras, eje y (derecha) indica OTUs y clasificación taxonómica en el mayor nivel de resolución, eje y (izquierda) indica agrupamiento jerárquico de OTUs de acuerdo patrón de conteos.

La figura 8-20 muestra el agrupamiento jerárquico en tres grandes grupos. Se puede observar que se formaron patrones de agrupamiento de OTUs de acuerdo a la salinidad (parte superior de la figura 8-20). Se ha demostrado que la salinidad en el suelo reduce la actividad y biomasa microbiana, y genera cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Andronov *et al.*, 2012). La salinidad reduce la biomasa microbiana principalmente porque el estrés osmótico resulta en el desecamiento y lisis de las células (Yuan *et al.*, 2007).

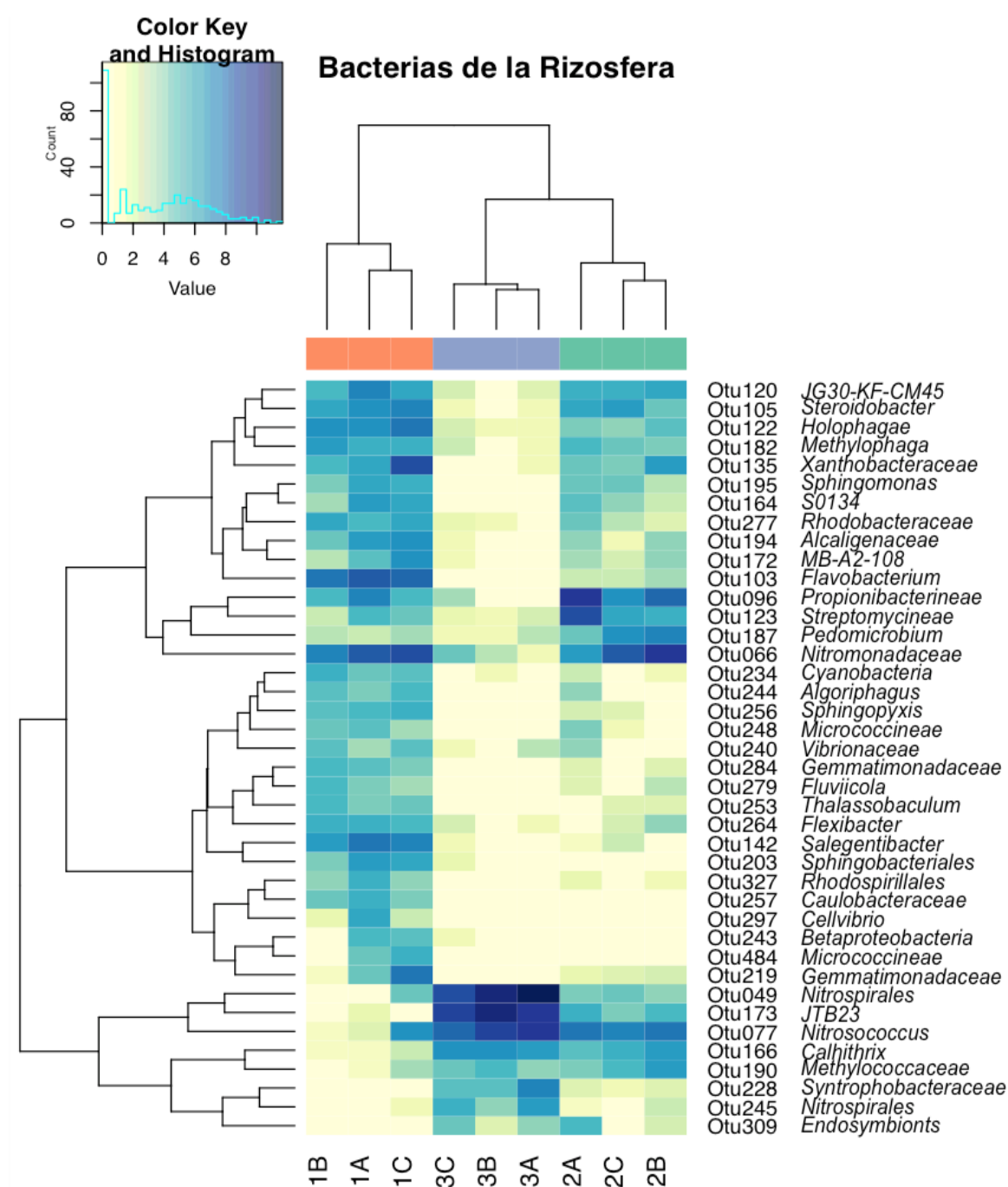


Figura 8-20: Mapa de calor y agrupamiento jerárquico de conteos transformados para los 40 OTUs con la varianza general más grande. En la parte superior de la gráfica, salinidad alta: violeta; salinidad media: verde; salinidad baja: naranja.

También se puede observar en la parte izquierda de la figura, un agrupamiento de los OTUs de acuerdo al patrón de los conteos encontrados a lo largo de los niveles de

salinidad (Figura 8-20). El primer grupo ubicado en la parte superior de la figura, muestra un patrón de mayores conteos de OTUs en los niveles de salinidad baja y media, pero conteos menores de OTUs en el nivel de salinidad alta (61,52 ppt). Este grupo está conformado por *JG30-KF-CM45*, *Steroidobacter*, *Holophagae*, *Methylophaga*, *Xanthobacteraceae*, *Sphingomonas*, *S0134*, *Rhodobacteraceae*, *Alcaligenaceae*, *MB-A2-108*, *Flavobacterium*, *Propionibacterineae*, *Streptomycineae*, *Pedomicrobium* y *Nitrosomonadaceae*.

El OTU 182 perteneciente al género *Methylophaga* corresponde a bacterias halófilas que han sido aisladas a partir de diversos ambientes marinos, se ha comprobado la capacidad de cepas de *Methylophaga* en la reducción de nitrato a nitrito mediante la expresión del gen putativo nitrato reductasa *narG* (Doronina *et al.*, 2003; Auclair *et al.*, 2010). El OTU 135 corresponde a la familia *Xanthobacteraceae*, la cual se caracteriza por tener miembros implicados en la fijación del nitrógeno como es el caso del género *Azorhizobium* (Oren, 2014). El OTU 066 perteneciente a la familia *Nitrosomonadaceae* se destaca por presentar uno de los más altos conteos, esta familia se caracteriza por ser un grupo en el cual todos sus representantes cultivables son litoautótrofos oxidadores de amonio, de esta manera juegan un papel importante en el ciclo del nitrógeno mediante el proceso llamado nitrificación en ambientes terrestres, de agua dulce, marinos y en plantas de tratamiento de aguas residuales (Prosser *et al.*, 2014).

El segundo grupo ubicado en la parte media de la figura, muestra un patrón de mayores conteos de OTUs en el nivel de salinidad baja y conteos cercanos a cero en los niveles de salinidad media y alta. Este grupo está conformado por *Cyanobacteria*, *Algoriphagus*, *Sphingopyxis*, *Micrococcineae*, *Vibrionaceae*, *Gemmatimonadaceae*, *Fluviicola*, *Thalassobaculum*, *Flexibacter*, *Salegentibacter*, *Sphingobacterales*, *Rhodospirillales*, *Caulobacteraceae*, *Cellvibrio*, *Betaproteobacteria*, *Micrococcineae* y *Gemmatimonadaceae*.

El OTU 234 está clasificado en el filo *Cyanobacteria*, este grupo de bacterias fotoautótrofas oxigénicas han sido reportadas como colonizadoras de raíces de plantas, así como su papel en la promoción de crecimiento vegetal y su importancia en la fuente de nitrógeno inorgánico para la planta debido a su capacidad de fijación de nitrógeno

(Chaparro *et al.*, 2014; Lundberg *et al.*, 2012; Prassana *et al.*, 2009). En ecosistemas de manglar, se ha demostrado que la estructura de las comunidades de *Cyanobacterias* a partir de sedimentos de diferentes manglares pueden ser influenciados de acuerdo al gradiente de salinidad del agua (Oliveira *et al.*, 2015; Rigonato *et al.*, 2013). Se ha reportado que *Cyanobacteria* adaptada a ambientes acuáticos con diferentes concentraciones de sal, utiliza una estrategia de *salt-out*, que se basa en la extrusión activa de iones tóxicos como Na^+ o Cl^- y la acumulación de solutos orgánicos compatibles (Allakhverdiev & Murata, 2008).

El OTU 142 corresponde al género *Salegentibacter*, el cual pertenece al clado de especies marinas de la familia *Flavobacteriaceae*, este género fue creado por McCammon y Bowman (2000). Dobson *et al.* (1991) aislaron e identificaron *Salegentibacter salegens* a partir de un lago hipersalino de la Antártida; Nedashkovskaya *et al.* (2005) aislaron y propusieron un nuevo género denominado *Salegentibacter mishustinae* sp. nov. a partir del erizo de mar *Strongylocentrotus intermedius* presente en el mar de Japón; lo anterior indica la fuerte adaptación de *Salegentibacter* a ecosistemas marinos (Bowman, 2006; Dobson *et al.*, 1991).

El OTU 240 pertenece al género *Vibrionaceae*, el cual a su vez pertenece al orden *Vibrionales*. De acuerdo a estudios anteriores, el orden *Vibrionales* ha sido encontrado en manglares siendo más abundantes en muestra rizosféricas que en sedimentos; se sabe de su asociación con metazoos y su ocurrencia como organismos de vida libre en ambientes marinos, sin embargo, reportes sobre el cultivo de *Vibrio spp* fijadora de nitrógeno a partir de rizósferas de manglar puede indicar su papel como promotor del crecimiento vegetal en la rizósfera de mangles (Criminger *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2011; Rameshkumar & Nair 2009).

El tercer grupo que está ubicado en la parte inferior de la figura, muestra un patrón de mayores conteos de OTUs en los niveles de salinidad alta, y menores conteos de OTUs en los niveles de salinidad media y baja. Este grupo está conformado por *Nitrospirales*, *JTB23*, *Nitrosococcus*, *Caldithrix*, *Methylococcaceae*, *Syntrophobacteraceae* y *endosymbionts*.

El OTU 049 pertenece al orden *Nitrospirales*, el cual se caracteriza por una alta diversidad fisiológica de sus miembros y contar con género oxidases de nitrito a nitrato y oxidadores de Fe^{+2} a Fe^{+3} (Daims, 2015). El OTU 173 corresponde a una clase denominada JTB23 perteneciente al filo *Proteobacteria*, ha sido identificada en ambientes marinos, por lo mayor ocurrencia en el nivel de mayor salinidad puede deberse a su adaptación fisiológica (Burgsdorf *et al.*, 2015; Kouridaki *et al.*, 2010).

El OTU 077 corresponde al género *Nitrosococcus*, el cual se caracteriza por especies Gram negativas, quimiolitotótrofos capaces de realizar la oxidación de amonio a nitrito (Klotz *et al.*, 2006). El OTU 166 pertenece al género *Caldithrix*, éste ha sido aislado o identificado mayormente en ambientes marinos en condiciones termófilas y en suelos de manglar, lo cual es congruente con las condiciones de estudio que corresponde a un manglar semiárido con temperatura ambiente promedio anual de 28,9 °C y con valores mínimos de 20 °C en temporada fría y valores máximos de 37 °C en temporada cálida (Gil-Torres *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010).

En resumen, se encontró varianza en los OTUs entre los diferentes niveles de salinidad, de los cuales se graficaron los 40 OTUs con la mayor varianza entre muestras. Los OTUs poseen diferentes niveles de resolución taxonómica. Los 40 principales OTUs con mayor varianza fueron: JG30-KF-CM45, *Steroidobacter*, *Holophagae*, *Methylophaga*, *Xanthobacteraceae*, *Sphingomonas*, S0134, *Rhodobacteraceae*, *Alcaligenaceae*, MB-A2-108, *Flavobacterium*, *Propionibacterineae*, *Streptomycineae*, *Pedomicrobium*, *Nitrosomonadaceae*, *Cyanobacteria*, *Algoriphagus*, *Sphingopyxis*, *Micrococcineae*, *Vibrionaceae*, *Gemmatimonadaceae*, *Fluviicola*, *Thalassobaculum*, *Flexibacter*, *Salegentibacter*, *Sphingobacteriales*, *Rhodospirillales*, *Caulobacteraceae*, *Cellvibrio*, *Betaproteobacteria*, *Micrococcineae*, *Gemmatimonadaceae*, JTB23, *Nitrosococcus*, *Caldithrix*, *Methylococcaceae*, *Syntrophobacteraceae* y endosymbionts.

8.7.5 Bacterias halotolerantes.

Con el fin de identificar la presencia y posibles diferencias en géneros de bacterias halotolerantes a través de las zonas de muestreo contrastantes en el nivel de salinidad, se realizó análisis estadístico del número de OTUs pertenecientes a estos grupos bacterianos (Tabla 8-6).

No se encontraron diferencias significativas en el número de OTUs de las bacterias halotolerantes encontradas entre las zonas de muestreo. La bacteria halotolerante con valores promedios de OTUs más altos fue del género *Halomonas*, la cual ha sido reportada en suelos de manglar (Soares *et al.*, 2013), así como presente en hojas de *A. germinans* (Soto-Ramírez *et al.*, 2007). Una cepa de ese género fue aislada de un campo petrolero en Túnez, África y fue capaz de degradar hidrocarburos de manera eficiente (Mnif *et al.*, 2009).

Tabla 8-6: Valores promedio de OTUs clasificados en grupos bacterianos halotolerantes.

Género	Salinidad Baja n=3	Salinidad Media n=3	Salinidad Alta n=3	P (Tukey HSD)
<i>Halomonas</i>	487,67 (273,46)a	98,00 (30,09)a	419,00 (68,22)a	ns
<i>Halobacillus</i>	111,33 (29,13)a	126,33 (18,82)a	59,00 (23,90)a	ns
<i>Salegentibacter</i>	188,33 (48,70)a	1,60 (1,20)a	0,33 (0,33)a	ns
<i>Salinimicrobium</i>	41,67 (27,41)a	15,00 (7,00)a	6,67 (3,38)a	ns
<i>Thiohalophilus</i>	15,33 (10,35)a	39,67 (14,68)a	53,00 (24,00)a	ns

n=número de réplicas. Letras diferentes en cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas, según análisis de comparaciones múltiples de Tukey. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: $p > 0,05$ o no significativo.

8.8 Predicción funcional de las comunidades microbianas presentes en suelos de manglar.

8.8.1 Análisis de Componentes Principales de los genes predichos.

Un total de 6.909 genes fueron predichos utilizando el software Picrust v.1.0.0; este resultado es similar a lo encontrado por Lopes *et al.* (2016), en el cual 6.900 genes fueron predichos a partir de secuencias del gen 16S rRNA en muestras de suelo y rizósfera asociada a caña de azúcar.

Mediante un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el software STAMP v. 2.1.3 se analizó y comparó la distribución de los genes predichos (Figura 8-21).

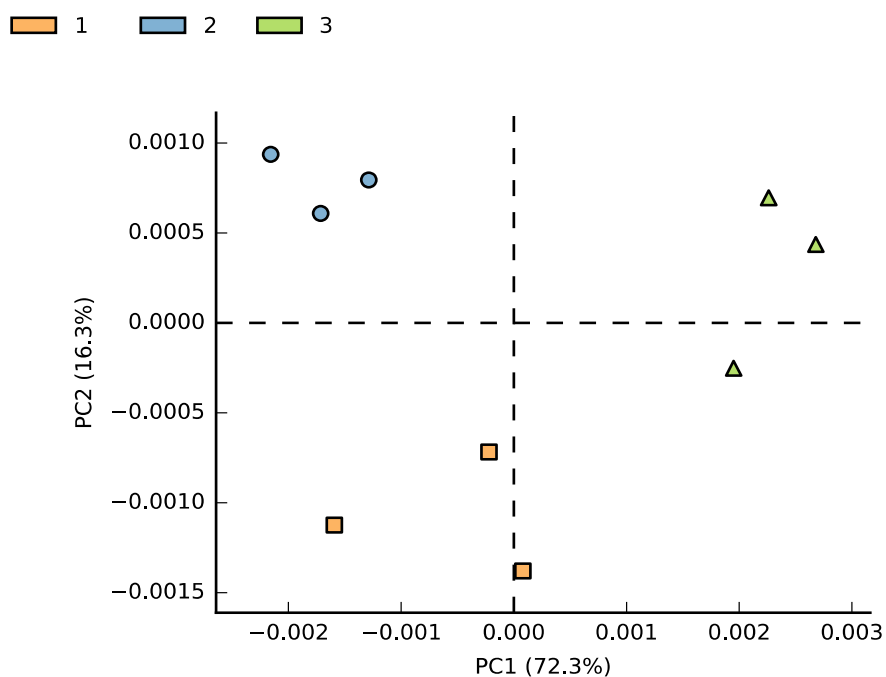


Figura 8-21: PCA de los genes predichos mediante el software PICRUST v.1.0.0 a partir de información del gen 16S, visualización mediante software STAMP v.2.1.3. Salinidad baja (naranja), salinidad media (azul) y salinidad alta (verde).

Se puede apreciar la formación de tres grupos de acuerdo a la abundancia de genes en cada muestra, separándose cada grupo en relación a la salinidad (Figura 8-21). La variación encontrada en la composición de genes predichos, fue también un hallazgo similar en el trabajo de Wang *et al.* (2016) en muestras de sedimento costero del mar de China, en el cual, las familias de genes funcionales predichos variaron en su proporción entre los sitios de muestreo. El PCA de la figura 8-21 explicó el 88,6% de la variabilidad de los datos y permitió separar la información de todos los genes predichos de acuerdo a la zona de muestreo o el nivel de salinidad de las mismas.

8.8.2 Predicción de funciones metabólicas.

Los genes predichos fueron categorizados por función usando el nivel 2 de categorización de ortología KEGG. Las funciones metabólicas de las comunidades microbianas en los tres puntos de muestreo predichas fueron analizadas mediante gráficas de barras de error extendidas con el fin de comparar en las proporciones promedio de las secuencias asignadas a cada función entre pares de grupos de datos (salinidad baja vs. Salinidad media, salinidad media vs. Salinidad alta y salinidad baja vs. Salinidad alta). Se realizó la comparación del perfil de funciones metabólicas predichas con PICRUSt, mediante gráficas de barras de error extendido con el software STAMP, entre las zonas de salinidad baja y media (Figura 8-22), entre las zonas de salinidad media y alta (Figura 8-23) y diferencias entre las funciones de las zonas de salinidad baja y alta (Figura 8-24).

En todos los casos, las funciones metabólicas graficadas corresponden a funciones con diferencias significativas ($p < 0,05$). La figura muestra diferencias en la proporción promedio de dos grupos de datos (niveles de salinidad), con los intervalos de confianza del 95%.

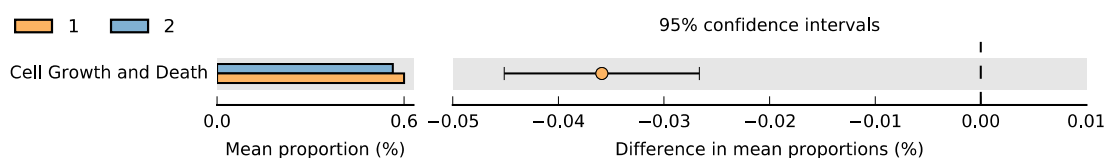


Figura 8-22: Predicción PICRUSt del perfil funcional de las comunidades microbianas basado en secuencias del gen 16S rRNA. Gráficas de barras de error extendidas indicando diferencias en el perfil funcional a los niveles de salinidad baja (1) y salinidad

media (2). Todas las lecturas no clasificadas fueron removidas. Las categorías fueron seleccionadas por el valor p calculado usando t-test Welch's *two-sided*.

En la comparación entre salinidad baja (1) y media (2) se observó diferencias significativas en sólo una categoría funcional (Figura 8-22). La función metabólica “crecimiento y muerte celular” en la salinidad baja (1) es más abundante que en la salinidad media (2).

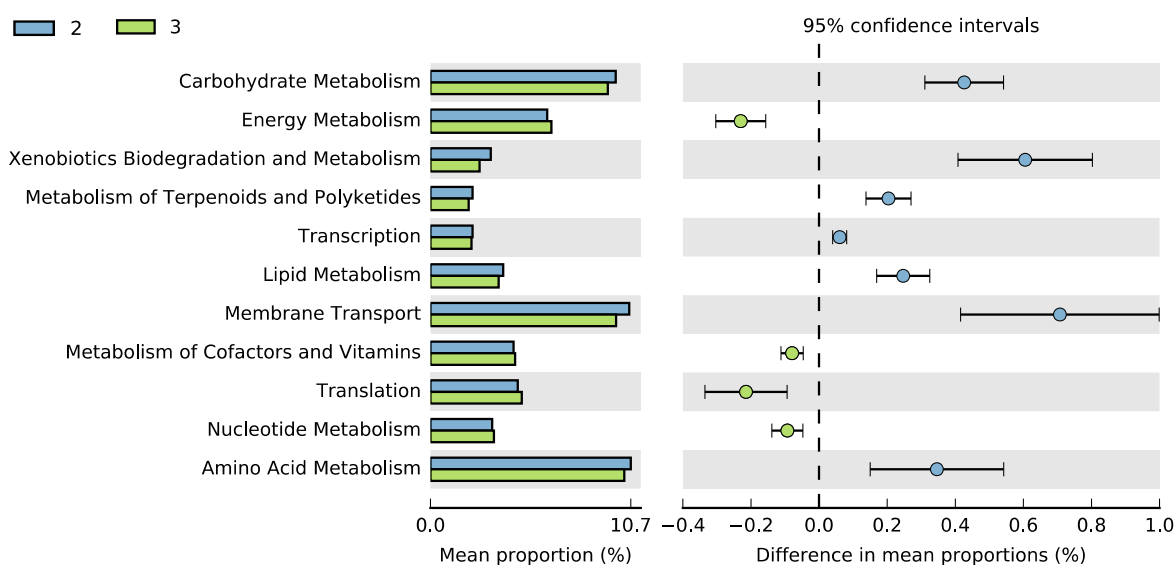


Figura 8-23: Predicción PICRUSt del perfil funcional de las comunidades microbianas basado en secuencias del gen 16S rRNA. Gráficas de barras de error extendidas indicando diferencias en el perfil funcional a los niveles de salinidad media (2) y salinidad alta (3). Todas las lecturas no clasificadas fueron removidas. Las categorías fueron seleccionadas por el valor p calculado usando t-test Welch's *two-sided*.

En la comparación entre salinidad media y alta se observó diferencias significativas en 11 categorías funcionales (Figura 8-23). Las siguientes funciones metabólicas fueron más abundantes en las comunidades microbianas de salinidad media (2): transporte de membrana, metabolismo y biodegradación de xenobióticos, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de lípidos, metabolismo de terpenoides y policétidos y transcripción. Las siguientes funciones metabólicas fueron más

abundantes en las comunidades microbianas de salinidad alta (3): metabolismo de nucleótidos, metabolismo de vitaminas y cofactores, traducción y metabolismo energético.

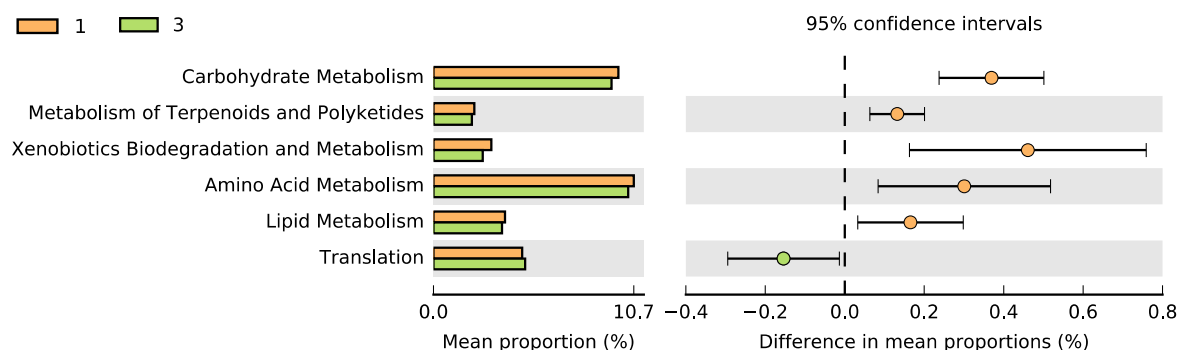


Figura 8-24: Predicción PICRUSt del perfil funcional de las comunidades microbianas basado en secuencias del gen 16S rRNA. Gráficas de barras de error extendidas indicando diferencias en el perfil funcional a los niveles de salinidad baja (1) y salinidad alta (3). Todas las lecturas no clasificadas fueron removidas. Las categorías fueron seleccionadas por el valor p calculado usando t-test Welch's *two-sided*.

En la comparación entre salinidad baja (1) y alta (3) se observó diferencias significativas en 6 categorías funcionales (Figura 8-24). Las siguientes funciones metabólicas fueron más abundantes en las comunidades microbianas de salinidad baja (1): metabolismo de carbohidratos, metabolismo de terpenoides y policétidos, metabolismo y biodegradación de xenobióticos, metabolismo de aminoácidos y metabolismo de lípidos. La traducción fue más alta en la comunidad microbiana de salinidad alta (3).

Las categorías con mayores diferencias en las medias proporcionales correspondieron a metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y metabolismo y biodegradación de xenobióticos. Se destacan entre las funciones encontradas, el metabolismo y degradación de xenobióticos, ya que esta función ha sido anteriormente reportado como una función presente en suelo de manglar (Jiménez *et al.*, 2015).

En resumen, los genes predichos más abundantes fueron principalmente asociados con crecimiento y muerte celular, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y traducción. Estas funciones metabólicas más abundantes encontradas corresponden a las principales funciones reportadas por Lopes *et al* (2016), mediante predicción, en suelo

rizosférico de caña de azúcar, sin embargo, ese estudio no reporta el metabolismo y biodegradación de xenobióticos. Lv *et al.* (2016) a partir de datos de predicción del gen 16S rRNA en sedimentos del plano mareal, identificaron la función de metabolismo y biodegradación de xenobióticos. El metabolismo de xenobióticos, es una función reportada en comunidades microbianas de suelo de manglar (Jiménez *et al.*, 2015).

8.8.3 Predicción de genes involucrados en mitigación de estrés por salinidad.

Un total de 17 genes relacionados a mecanismos de tolerancia al estrés por salinidad en bacterias y mitigación al estrés en planta (actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa [ACC] deaminasa) fueron predichos (Tabla 8-7). Los genes asociados a tolerancia al estrés por salinidad corresponden a la síntesis de prolina, ectoína, trehalosa, glucosilglicerol, betaína, glutamato, glutamina y transportadores de prolina y betaína.

Se identificó el gen *AcdS* que codifica para la enzima ACC [EC:3.5.99.7] y el gen regulador *AcdB* que codifica para la glicerofosforil diester fosfodiesterasa [EC:3.1.4.46]. Este último forma un complejo con la molécula de ACC, activando la transcripción del gen *AcdS* por unión con la región promotora (Singh *et al.*, 2015). No se observaron diferencias significativas de estos genes a través de las zonas de muestreo contrastantes en salinidad. La predicción del gen *AcdS* puede indicar la presencia potencial de la actividad que previene el estrés en plantas por salinidad, favoreciendo el desarrollo de las plantas de mangle (Glick, 2014).

Los genes relacionados a la biosíntesis del osmolito compatible prolina fueron identificados, *proA* y *proC* no presentaron diferencias significativas, pero el gen *proB* sí presentó diferencias significativas. La biosíntesis de prolina ocurre a partir de glutamato y comprende tres pasos principales, en los cuales participan las enzimas glutamato-5-kinasa [EC:2.7.2.11], glutamato-5-semialdehído dehidrogenasa [EC:1.2.1.41] y pirrolina-5-carboxilato reductasa [EC:1.5.1.2]. La prolina es un osmolito que se acumula bajo condiciones de estrés, tanto en plantas como en eubacterias. Chen *et al.* (2007) introdujeron los genes *proBA* derivados de *Bacillus subtilis* en *Arabidopsis thaliana*,

resultando en niveles más altos de prolina libre y aumento de la tolerancia frente al estrés osmótico.

Se identificaron genes relacionados a la biosíntesis de ectoína *ectA*, *ectB* y *ectC*; también se encontró el gen *ectD* que es responsable de la conversión de ectoína a hidroxiectoína. Ninguno de estos genes presentaron diferencias significativas. La ectoína se considera el osmolino más abundante en la naturaleza, el cual es común en bacterias heterótrofas aerobias (Galinski, 1995). Un estudio de calorimetría demostró que *Halomonas elongata* produce ectoína como su principal soluto compatible, optimizando su metabolismo para disminuir el costo de energía que requiere la adaptación osmótica (Maskow & Babel, 2001).

Los genes relacionados a la biosíntesis de trehalosa, *otsA* y *otsB* presentaron diferencias significativas. La trehalosa es un disacárido de glucosa no reductor, el cual se encuentra en una gran variedad de organismos, tanto en bacterias, archaeas y hongos. La trehalosa juega un papel importante en la homeóstasis metabólica y tolerancia al estrés (Turan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2015). Se ha reportado la trehalosa como un soluto secundario involucrado en la osmoprotección en niveles de salinidad baja de *Chromohalobacter salexigens*, en la cual la síntesis de trehalosa fue osmoregulada a nivel transcripcional (Reina-Bueno *et al.*, 2012).

El gen *ggpS* que codifica para la glucosilglicerol-fosfato sintasa [EC:2.4.1.213] no presentó diferencias significativas. El producto enzimático consiste en un soluto compatible denominado glucosilglicerol, el cual puede ser obtenido por el microorganismo por la síntesis *de novo* y por la absorción activa a partir del medio. La síntesis del glucosilglicerol en respuesta al estrés por salinidad es regulado a nivel transcripcional y a nivel bioquímico; este mecanismo fue estudiado en el organismo modelo *Synechocystis sp.* con el fin de determinar las estrategias de aclimatación a altas concentraciones de sales en cianobacterias (Klähn *et al.*, 2010).

El gen *opuA* esta relacionado con el transporte de glicina betaína y prolina. Este gen no presentó diferencias significativas. La glicina betaína es un soluto compatible que es encontrado en muchas bacterias que pueden tomarlo del ambiente por medio de transportadores. Estudios de la fisiología de *Bacillus subtilis* han demostrado que los

principales solutos compatibles que usa esta bacteria están químicamente relacionados a prolina o glicina betaína (Bashir *et al.*, 2014); y la absorción de glicina betaína por *B. subtilis* es realizada por un sistema de transporte de la familia de transportadores Opu (*osmoprotectans uptake*) (Bremer, 2002). Asimismo, estudios reportados sugieren que la actividad de este tipo de transportadores ocurre en respuesta al aumento de la osmolaridad externa, por lo tanto, permite a las células bacterianas reaccionar con un aumento de la absorción de solutos compatibles como la glicina betaína para mitigar el estrés osmótico (Poolman *et al.*, 2004; De Bruijn, 2016).

Los genes *betA* y *betB* implicados en la vía metabólica de oxidación de colina para la síntesis de glicina betaína fueron predichos y presentaron diferencias significativas entre zonas de muestreo. La absorción de solutos como la glicina betaína es preferida por los microorganismos sobre la biosíntesis *de novo*, debido a razones de costo energético, además la presencia externa de esos solutos suprimen la biosíntesis. Sin embargo, en ausencia de glicina betaína en el ambiente, ésta es sintetizada a partir del precursor extracelular colina lo cual podría significar un beneficio energético, siendo ventajoso en ambientes ricos en colina como el suelo (Scholz *et al.*, 2016).

Genes involucrados en la biosíntesis de glutamato y glutamina, *gdh1* y *glnA2* respectivamente, no presentaron diferencias significativas. De acuerdo a Saum y Müller (2007), *Halobacillus halophilus* enciende su estrategia de osmolitos de acuerdo a las concentraciones de sales del medio, encontrando que su crecimiento a niveles moderados de salinidad sintetiza principalmente glutamato y glutamina, mientras que a niveles altos de salinidad el soluto dominante es la prolina (Shiyan *et al.*, 2015).

Tabla 8-7: Selección de genes involucrados en tolerancia a estrés por salinidad y número promedio de genes predichos por PICRUST.

Función	Nombre del gen	Actividad del gen KEGG [Número EC]	Número de genes predichos por réplica de muestreo			P (Tukey HSD)
			Salinidad Baja	Salinidad Media	Salinidad Alta	
ACC deaminasa	<i>AcdB</i>	glicerofosforil diester fosfodiesterasa [EC:3.1.4.46]	44613 (2250) a	44202 (408) a	45027 (2083) a	ns
	<i>AcdS</i>	1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa [EC:3.5.99.7]	2724 (101) a	2124 (100) a	1901 (639) a	ns
Biosíntesis de prolina	<i>proB</i>	glutamato 5-kinasa [EC:2.7.2.11]	24229 (1756) b	23733 (98) b	28686 (1216) a	*
	<i>proA</i>	glutamato-5-semialdehído dehidrogenasa [EC:1.2.1.41]	26679 (2047) a	26342 (116) a	31196 (1381) a	ns
	<i>proC</i>	pirrolina-5-carboxilato reductasa [EC:1.5.1.2]	32772 (2375) a	32128 (400) a	36128 (1512) a	ns
Biosíntesis de ectoína	<i>ectA</i>	L-2,4-diaminobutírico ácido acetiltransferasa [EC:2.3.1.178]	1471 (170) a	1789 (84) a	2278 (218) a	ns
	<i>ectB</i>	diaminobutirato-2-oxoglutarato transaminasa [EC:2.6.1.76]	4607 (271) a	6231 (368) a	4827 (412) a	ns
	<i>ectC</i>	L-ectoína sintasa [EC:4.2.1.108]	1694 (166) a	1854 (92) a	2387 (214) a	ns
	<i>ectD</i>	ectoína hidroxilasa [EC:1.14.11.-]	1821 (88) a	1509 (127) a	2193 (172) a	ns

Valores promedios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según análisis de comparaciones múltiples de Tukey. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns no significativo.

Tabla 8-7: (continuación)

Función	Nombre del gen	Actividad del gen KEGG [Número EC]	Número de genes predichos por réplica de muestreo			P (Tukey HSD)
			Salinidad Baja	Salinidad Media	Salinidad Alta	
Biosíntesis de trehalosa	otsA	alfa-trehalosa-fosfato sintasa [EC:2.4.1.15]	12610 (800) ab	13602 (185) a	10822 (584) b	**
	otsB	trehalosa-fosfatasa [EC:3.1.3.12]	10349 (532) b	11939 (178) a	8450 (312) c	***
Biosíntesis de glucosilglicerol	ggpS	glucosilglicerol-fosfato sintasa [EC:2.4.1.213]	203 (23) a	46 (15) a	5 (2) a	ns
Transporte de prolina y betaína	opuA	glicina betaína/prolina sistema de transporte. Proteína de union al ATP [EC:3.6.3.32]	8075 (434) a	10529 (122) a	8870 (688) a	ns
Síntesis de betaína	betA	colina dehidrogenasa [EC:1.1.99.1]	10781(306) a	10881(281) a	8044(1270) b	*
	betB	betaína-aldehído dehidrogenasa [EC:1.2.1.8]	15464(280) b	21161(806) a	12702(938) b	***
Síntesis de glutamato	gdh1	glutamato dehidrogenasa [EC:1.4.1.2]	10132 (733) a	10996 (417) a	9113 (707) a	ns
Síntesis de glutamina	glnA2	glutamina sintetasa [EC:6.3.1.2]	65776 (3815) a	68157 (563) a	72896 (3729) a	ns

Valores promedios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según análisis de comparaciones múltiples de Tukey. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns no significativo.

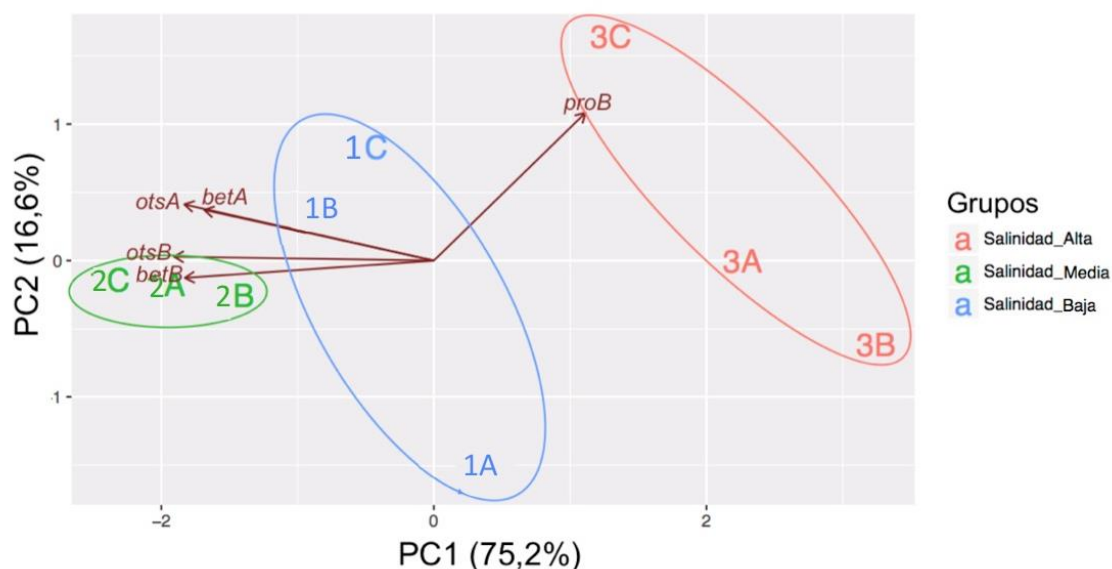


Figura 8-25: PCA de los genes predichos relacionados a tolerancia a salinidad, a lo largo del gradiente de salinidad.

El PCA de la figura 8-25 explicó el 91,8% de la variabilidad de los datos, se encontró una separación marcada de las muestras de acuerdo a su salinidad. Las réplicas de la zona de salinidad media fueron agrupadas en relación a los niveles de los genes predichos *betA*, *betB*, *otsA* y *otsB*. Los genes *otsA* y *otsB* están relacionados a la biosíntesis de trehalosa (Turan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2015). Los genes *betA* y *betB* están implicados en la vía metabólica de oxidación de colina para la síntesis de glicina betaína. (Scholz *et al.*, 2016).

Por otro lado, las réplicas de salinidad alta fueron agrupadas en relación a los niveles del gen *proB*, el cual está relacionado a la biosíntesis de prolina. Este hallazgo puede estar relacionado con los reportes que señalan que la prolina es usada por los microorganismos para la mitigación del estrés por salinidades altas, ya que se ha encontrado este soluto como dominante en *Halobacillus halophilus* esa condición de salinidad (2,0-3,0 M NaCl) (Saum & Müller, 2007; Shiyan *et al.*, 2015).

9. Conclusiones y Recomendaciones.

9.1 Conclusiones.

El presente trabajo entrega la riqueza y estructura de las comunidades de bacterias y archaeas asociadas a la rizósfera del mangle *A. germinans* a lo largo de un gradiente de salinidad, identificadas mediante secuenciación del gen 16S rRNA a partir de ADN total del suelo rizosférico; asimismo, se presenta información del potencial funcional de las comunidades microbianas, mediante predicción PICRUSt.

Con los análisis de la estructura de las comunidades microbianas, a nivel de dominio, se identificó la proporción de la comunidad de bacterias, la cual fue de 0,10% a 45,27%, siendo más abundante que la comunidad de archaeas con una proporción de 0 a 0,11%.

Además, se encontraron diferencias significativas de abundancias entre los grupos taxonómicos a lo largo del gradiente de salinidad, por ejemplo, a nivel de filo se encontraron 25 grupos con diferencias significativas entre los niveles de salinidad, a nivel de clase 75 grupos, a nivel de orden 90, a nivel de familia 97, a nivel de género 162 y a nivel de especie 161.

Los análisis de la estructura de la comunidad bacteriana basada en OTUs presentó patrones de grupos de OTUs de acuerdo a las mayores varianzas a lo largo del nivel de salinidad, en diferentes niveles de taxonómicos. Los 10 OTUs con mayores varianzas fueron *JG30-KF-CM45*, *Steroidobacter*, *Holophagae*, *Methylophaga*, *Xanthobacteraceae*, *Sphingomonas*, *S0134*, *Rhodobacteraceae*, *Alcaligenaceae* y *MB-A2-108*,

El análisis de correspondencia canónica indican la influencia de las variables físicoquímicas del suelo salinidad, carbono orgánico y arcilla, sobre la distribución de OTUs. El carbono orgánico y la salinidad influyen de manera inversamente proporcional la distribución de OTUs.

La predicción del metagenoma basado en las secuencias del gen 16S rRNA mediante PICRUSt, permitió identificar 6.909 genes, de los cuales, se identificaron 17 genes relacionados a mecanismos de tolerancia al estrés por salinidad en bacterias y mitigación al estrés en planta. Los genes *betA*, *betB*, *otsA*, *otsB*, *otsA otsB* y *proB*, presentaron diferencias significativas en sus abundancias entre los niveles de salinidad. El gen *proB* implicado en la síntesis de prolina, presentó mayores abundancias en el nivel de salinidad alta, lo cual ha sido reportado.

Los genes predichos se agruparon y agruparon por funciones metabólicas, las categorías metabólicas predichas presentaron patrones similares entre las muestras, con dominancia de vías relacionadas al mantenimiento de la vida microbiana, tales como metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, cofactores y vitaminas, además, se predijo el metabolismo y degradación de xenobióticos.

9.2 Recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda realizar análisis que sean complementarios a la predicción funcional, por ejemplo mediante la evaluación de actividades biológicas y enzimáticas en suelos con gradientes de salinidad que permitan determinar la presencia tanto de los genes como de las proteínas que presuntamente puedan estar involucrados en procesos de tolerancia al estrés por salinidad.

Se propone realizar análisis de expresión diferencial de RNAs con el fin de encontrar cambios de expresión que permitan identificar respuestas metabólicas frente a las variaciones en los niveles de salinidad en suelos de manglar, enfocándose en vías metabólicas claves relacionadas a la tolerancia a estrés por salinidad.

Por otro lado, se recomienda identificar los patrones de expresión génica microbiana que se presenten de manera estable y repetida sobre el gradiente de salinidad, con el fin de sugerir estrategias de mitigación de impactos ambientales en suelos salinos mediante indicadores específicos.

A. Anexo A: Protocolo para la extracción de ADN a partir de suelo (Kit comercial).

Para la extracción de ADNg se empleó el Kit PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc). Debido a que no se obtuvo el rendimiento necesario para la secuenciación, se realizaron modificaciones al protocolo provisto por MoBio laboratories, Inc. El protocolo establecido tras varios ensayos y con el que se obtuvo el mejor rendimiento e integridad fue el siguiente:

1. Al tubo PowerLyzer Glass Bead, 0.1 mm, agregar 0,5 gramos de suelo.
2. Agregar 750 µL de Bead Solution al Glass Bead Tube.
3. Vortex suave para mezclar.
4. Revisar Solución C1. Si la Solución C1 está precipitada, calentar a 60°C hasta disolver.
5. Agregar 60 µL de Solución C1 e invertir varias veces para mezclar.
6. Colocar tubos horizontalmente en Vortex, cerrar bien la tapa de tubos y agitar por 10 min a velocidad máxima.
7. Centrifugar tubos a 10.000 g o 12000 rpm por 30 segundos a T° ambiente.
8. Transferir sobrenadante a un Collection Tube de 2 ml (se esperan 400 a 500 µL sobrenadante)
9. Agregar 250 µL de Solución C2 y mezclar por inversión
10. Incubar a 4°C por 5 minutos.
11. Centrifugar los tubos a T° ambiente por 1 minuto a 10.000 g o 12000 rpm.
12. Evitando el pellet, transferir hasta y no más de 600ul de sobrenadante en un tubo limpio Collection Tube de 2ml.
13. Agregar 200 µL de Solución C3 y mezclar por inversión.
14. Incubar a 4°C por 5 min.
15. Centrifugar a T° ambiente por 1 min a 10.000 g o 12000 rpm.

16. Evitando el pellet, *transferir hasta y no más de 750 µL* del sobrenadante en un Collection Tube de 2 ml.
17. Agitar la Solución C4 antes de usar.
18. Agregar 1.200 µL de Solución C4 al sobrenadante y mezclar por inversión.
19. Llenar 675 µL de la mezcla anterior en una Spin Filter.
20. Centrifugar a 10.000 *g* o 12.000rpm por 1 minuto a T° ambiente.
21. Descartar el flujo que pasó por la columna y agregar adicionalmente 675 µL de sobrenadante en Spin Filter.
22. Centrifugar a 10.000 *g* o 12.000rpm por 1 minuto a T° ambiente. (repetir hasta terminar)
23. Agregar 500 µL de Solución C5.
24. Centrifugar a 10.000 *g* o 12.000rpm por 30 segundos a T° ambiente.
25. Descartar el flujo que pasó por la columna.
26. Centrifugar a 10.000 *g* o 12.000rpm por 1 minuto a T° ambiente.
27. Dejar secar las columnas a temperatura ambiente para evitar dejar residuos de solución C5 la cual contiene etanol.
28. Ubicar con cuidado la columna en un Colection Tube 2 ml nuevo.
29. Agregar 60 µL de Agua grado PCR al centro de la membrana blanca de la columna.
30. Centrifugar a 10.000 *g* o 12.000rpm por 30 segundos a T° ambiente.
31. Almacenar rápidamente el DNA a -20°C.

B. Anexo B: Comparaciones de abundancias relativas a nivel de *Phylum* con otros trabajos.

Tabla Anexo B-1: Comparación de las abundancias relativas de los principales grupos microbianos más abundantes a nivel de *Phylum*.

Grupos a nivel de <i>Phylum</i>	Proporción manglar de La Guajira	Proporción en estudio de Andreote <i>et al.</i> (2012)	Proporción en estudio de Ligi <i>et al.</i> (2014)
<i>Proteobacteria</i>	38,2-46,6%	47.1–56.3%	22.7–59.2%
<i>Actinobacteria</i>	4,4-15,2%	5.4–12.2%	2.0–27.8%
<i>Bacteroidetes</i>	5,1-12,5%	3.8–11.8%	5.0–14.3%
<i>Planctomycetes</i>	4,5-9,3%	1.2–3.8%	1.0–3.5%
<i>Chloroflexi</i>	4,2-6,8%	1.3–5.4%	1.4–5.0%
<i>Gemmatimonadetes</i>	2,8-5,57%	-	0.5–7.8%
<i>Acidobacteria</i>	3,4-5,9%	0.0–2.7%	4.5–28.5%
<i>Firmicutes</i>	0,94-5,35%	10.5–13.8%	0.1–4.0%

C. Anexo C: Grupos taxonómicos con diferencias significativas entre los niveles de salinidad, valores de p y número de secuencias.

Tabla Anexo C-1: Grupos taxonómicos a nivel de *phylum* con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).

Phylum	p-values	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	Lecturas
p__Proteobacteria	7,E-03	26136	33364	33504	26404	25916	25753	28251	27269	34487	261084
p__Actinobacteria	4,E-04	4827	3810	4061	9495	7919	10225	3614	2872	3502	50325
p__Gemmatimonadetes	1,E-02	3187	3537	4525	3456	4777	3689	5836	5433	5774	40214
p__Planctomycetes	3,E-03	2866	4307	2830	4063	3790	3151	5911	6334	6098	39350
p__Firmicutes	4,E-02	2753	2541	929	3055	2662	3638	1387	872	1321	19158
p__SBR1093	3,E-05	54	234	286	803	936	965	1386	1247	1347	7258
p__OD1	8,E-03	694	1067	954	232	127	175	272	372	906	4799
p__BRC1	3,E-03	438	624	351	138	132	145	132	137	240	2337
p__Verrucomicrobia	2,E-02	379	312	482	192	173	238	50	142	242	2210
p__TM7	6,E-04	448	685	454	222	83	62	60	71	60	2145
p__Caldithrix	4,E-03	11	15	167	121	195	240	307	361	407	1824
p__[Caldithrix]	1,E-02	10	30	144	118	125	49	202	293	259	1230
p__Chlorobi	6,E-04	242	232	356	96	80	76	5	21	58	1166
p__NKB19	4,E-03	109	104	86	40	22	28	38	56	68	551
p__WS6	1,E-02	111	191	61	20	19	8	5	2	2	419
p__Aquificae	1,E-03	8	14	22	39	50	42	32	29	29	265
p__OP3	2,E-03	29	31	32	15	13	8	22	27	36	213
p__Armatimonadetes	3,E-02	20	22	13	30	35	36	13	24	6	199
p__OP11	3,E-03	28	41	55	17	9	4	11	5	11	181
p__GN04	3,E-03	24	18	17	10	5	4	24	30	36	168
p__OP1	2,E-04	0	0	2	8	0	2	49	37	37	135
p__WS2	6,E-05	29	52	44	5	1	0	0	1	0	132
p__WPS-2	3,E-03	15	29	20	10	3	3	3	4	0	87

p__Lentisphaerae	2,E-03	13	13	17	3	0	1	0	3	8	58
p__Kazan-3B-28	4,E-03	3	3	6	0	1	0	0	0	0	13

Tabla Anexo C-2: Grupos taxonómicos a nivel de clase con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).

Clase	p-values	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	Lecturas
c__Gammaproteobacteria	4,E-04	8539	12052	9866	9243	8514	8033	13167	12803	16790	99007
c__Alphaproteobacteria	8,E-04	8440	10164	9669	8001	7663	7812	5772	5467	8100	71088
c__Acidimicrobiia	2,E-03	2941	2803	1992	5346	5279	6938	2701	2323	2881	33204
c__Acidobacteria-6	3,E-02	1457	2029	2357	2551	2693	2287	2077	1450	1387	18288
c__Phycisphaerae	5,E-04	809	1594	908	1253	1335	1014	2908	3317	3105	16243
c__Anaerolineae	4,E-02	2059	2118	1988	1692	1649	1255	1678	1076	1386	14901
c__S085	1,E-02	719	1049	888	1696	2188	1732	1806	1460	1164	12702
c__Betaproteobacteria	2,E-02	1667	1342	2269	801	1989	1522	275	323	486	10674
c__Actinobacteria	2,E-02	1175	555	1000	2587	1255	1349	342	126	207	8596
c__Gemm-6	7,E-03	7	7	172	231	1256	363	2646	1959	1559	8200
c__Gemm-5	7,E-03	1366	867	1446	1235	958	1292	212	231	463	8070
c__Cytophagia	7,E-03	1282	1426	1033	667	610	362	197	352	757	6686
c__BPC102	7,E-03	180	553	485	753	790	699	771	844	810	5885
c__VHS-B5-50	8,E-04	47	232	284	764	909	954	795	741	637	5363
c__Clostridia	3,E-02	393	160	350	648	684	958	592	397	321	4503
c__Gemm-1	8,E-03	123	95	582	373	415	240	826	905	909	4468
c__SAR202	6,E-03	49	170	218	444	761	367	714	679	706	4108
c__Gemm-4	5,E-03	142	196	200	350	714	442	671	603	775	4093
c__Nitriliruptoria	1,E-04	261	218	275	886	720	1000	231	191	239	4021
c__ZB2	2,E-02	471	879	744	189	102	142	183	235	715	3660
c__TK17	8,E-04	431	585	591	275	233	228	359	447	466	3615
c__Pla3	3,E-05	36	160	26	327	394	269	763	642	772	3389
c__RB25	4,E-03	157	68	214	209	290	266	384	438	429	2455

c__Solibacteres	3,E-02	389	369	323	263	203	228	150	256	187	2368
c__Ellin6529	2,E-02	631	259	851	156	143	189	45	32	38	2344
c__Thermomicrobia	3,E-02	518	267	263	369	316	399	48	44	101	2325
c__EC214	2,E-07	7	2	2	39	27	11	591	506	710	1895
c__Caldithrixae	4,E-03	11	15	167	121	195	240	307	361	407	1824
c__TM7-1	9,E-04	399	599	331	110	53	34	37	54	38	1655
c__PRR-11	5,E-03	330	372	234	98	85	101	96	108	196	1620
c__AT-s2-57	1,E-02	55	130	99	194	144	197	186	134	188	1327
c__KSB1	1,E-02	10	30	144	118	125	49	202	293	259	1230
c__BD7-11	8,E-05	107	130	93	54	32	29	172	189	210	1016
c__Bacteroidia	2,E-02	331	126	265	39	48	36	15	39	32	931
c__Sphingobacteria	2,E-02	355	227	149	57	20	45	15	9	23	900
c__ABY1	7,E-03	135	126	157	36	23	29	65	124	163	858
c__Gemm-3	1,E-03	273	196	212	77	47	44	2	2	4	857
c__DA052	7,E-03	2	0	100	71	65	19	184	147	266	854
c__[Pedosphaerae]	2,E-02	163	101	224	66	63	98	20	23	56	814
c__Ignavibacteria	2,E-02	172	88	244	64	56	70	0	7	28	729
c__NPL-UPA2	2,E-02	108	252	117	40	47	44	36	29	44	717
c__iii1-8	8,E-03	151	124	305	19	28	10	1	1	3	642
c__C6	6,E-03	61	119	101	35	46	40	51	50	57	560
c__Acidobacteriia	1,E-04	136	140	112	25	38	31	13	12	22	529
c__Verrucomicrobiae	4,E-03	115	85	104	29	28	19	7	20	53	460
c__B142	1,E-02	97	174	53	20	19	8	5	2	2	380
c__[Chloracidobacteria]	2,E-02	115	44	165	11	4	12	1	2	13	367
c__[Brocadia e]	2,E-02	30	37	40	16	39	18	47	49	73	349
c__OPB56	2,E-02	62	142	53	11	9	3	4	14	28	326
c__TA18	3,E-02	127	87	39	15	2	7	12	0	7	296
c__Aquificae	1,E-03	8	14	22	39	50	42	32	29	29	265
c__Coriobacteriia	3,E-03	11	4	9	59	49	49	14	39	21	255
c__SM2F11	3,E-03	85	60	52	4	0	4	8	4	6	223
c__PBS-25	8,E-03	27	27	27	11	10	8	17	24	35	186
c__MJK10	9,E-03	20	43	40	15	2	3	14	15	14	166
c__SJA-176	2,E-02	9	5	12	30	31	35	13	24	3	162
c__At12OctB3	7,E-03	22	68	46	10	1	8	1	0	5	161

c__GN15	2,E-03	24	18	17	3	5	3	23	30	31	154
c__[Acetothermia]	2,E-04	0	0	2	8	0	2	49	37	37	135
c__SHA-109	4,E-05	29	50	44	5	1	0	0	1	0	130
c__TK10	1,E-02	14	16	23	19	18	6	0	0	1	97
c__Gemmatimonadetes	7,E-05	22	41	32	1	0	0	0	0	0	96
c__TSBW08	2,E-03	19	23	14	5	5	2	2	4	8	82
c__[Leptospirae]	2,E-02	33	17	15	1	1	2	4	2	3	78
c__WCHB1-64	4,E-03	14	30	15	4	4	0	1	0	2	70
c__GN10	3,E-03	25	17	15	2	0	0	0	0	0	59
c__[Lentisphaeria]	2,E-03	13	13	17	3	0	1	0	3	8	58
c__Mb-NB09	3,E-03	3	2	1	3	2	0	16	9	22	58
c__SHA-26	6,E-03	4	0	6	16	11	10	4	2	0	53

Tabla Anexo C-3: Grupos taxonómicos a nivel de orden con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).

Orden	p-values	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	Lecturas
Unclassified	1,E-02	8756	10984	11965	9732	11526	9562	15968	13798	14221	106512
o__Acidimicrobiales	2,E-03	2941	2803	1992	5346	5279	6938	2701	2323	2881	33204
o__Thiotrichales	2,E-04	2741	3243	3061	2939	3061	2449	4663	4618	4930	31705
o__Rhizobiales	3,E-03	3280	3362	3616	3146	2864	3580	1742	1647	2542	25779
o__Chromatiales	1,E-05	683	859	1026	1469	1429	1559	4193	4701	4668	20587
o__NB1-j	2,E-03	494	495	892	1461	1736	1527	2097	3190	3163	15055
o__Phycisphaerales	2,E-04	540	1246	646	1080	1057	784	2716	3040	2896	14005
o__Desulfuromonadales	4,E-02	1396	3393	1971	864	780	795	1400	998	893	12490
o__iii1-15	2,E-04	1291	1699	1906	951	1095	949	568	571	507	9537
o__Actinomycetales	2,E-02	1173	555	994	2586	1254	1345	341	124	204	8576
o__[Marinicellales]	1,E-02	1328	2299	1154	780	747	699	379	404	692	8482
o__Rhodobacterales	2,E-04	1674	2310	1792	902	446	388	195	233	488	8428
o__S0208	2,E-03	919	1162	1079	538	615	483	1000	729	810	7335

o__BPC015	2,E-03	65	288	310	135 2	140 8	119 2	127 8	702	693	7288
o__Cytophagales	7,E-03	128 2	142 6	103 3	667	610	362	197	352	757	6686
o__B110	5,E-03	156	552	301	703	779	675	751	813	797	5527
o__Caldilineales	9,E-03	843	658	586	696	737	499	219	175	175	4588
o__Gemmatales	4,E-03	396	308	301	569	562	575	383	305	302	3701
o__Nitriliruptorales	1,E-02	235	199	241	827	409	898	213	181	233	3436
o__HTCC2188	3,E-03	428	434	524	389	350	279	145	133	290	2972
o__Clostridiales	3,E-02	288	110	280	448	438	629	356	166	144	2859
o__Thiohalorhabdals	2,E-02	119	283	89	393	348	549	263	172	362	2578
o__HOC36	9,E-03	102	177	89	213	353	370	320	307	476	2407
o__Solibacterales	3,E-02	387	369	323	263	198	228	148	256	185	2357
o__Rhodocyclales	7,E-06	525	761	578	74	98	67	9	10	10	2132
o__Sediment-1	4,E-02	108	90	265	329	335	275	190	206	315	2113
o__Caldithirixales	4,E-03	11	15	167	121	195	240	307	361	407	1824
o__AKYG1722	9,E-03	319	225	165	312	261	355	46	43	97	1823
o__Bdellovibrionales	4,E-03	312	420	250	167	62	80	95	82	116	1584
o__Ucn15732	1,E-02	10	30	144	118	125	49	202	293	259	1230
o__Solirubrobacterales	3,E-02	119	101	203	156	173	279	79	53	50	1213
o__Methylococcales	6,E-03	11	9	39	96	151	73	147	230	188	944
o__Bacteroidales	2,E-02	331	126	265	39	48	36	15	39	32	931
o__Sphingobacterales	2,E-02	355	227	149	57	20	45	15	9	23	900
o__WD2101	7,E-03	163	170	119	99	167	92	12	33	23	878
o__[Pedosphaerales]	2,E-02	163	101	224	66	63	98	20	23	56	814
o__Thermoanaerobacterales	6,E-03	18	28	34	92	129	94	137	153	101	786
o__Ignavibacteriales	2,E-02	172	88	244	64	56	70	0	7	28	729
o__DS-18	8,E-03	151	124	304	19	28	10	1	1	3	641
o__E29	5,E-04	0	0	8	8	45	0	168	128	249	606
o__BD7-3	1,E-02	88	131	80	53	39	21	48	39	77	576
o__Spirobacillales	3,E-02	140	132	65	70	31	33	8	10	44	533
o__TK18	1,E-02	20	4	1	64	56	52	74	148	111	530
o__Acidobacteriales	1,E-04	136	140	112	25	38	31	13	12	22	529
o__LD1-PA13	1,E-03	15	0	50	20	6	3	127	144	112	477
o__Verrucomicrobiales	4,E-03	115	85	104	29	28	19	7	20	53	460
o__Burkholderiales	2,E-02	156	50	145	23	27	16	9	2	11	439
o__CCM11a	1,E-02	28	75	33	21	25	6	78	91	73	430
o__FAC87	2,E-02	70	138	53	28	21	16	11	14	24	375
o__Rickettsiales	2,E-03	50	53	47	9	2	15	70	67	48	361

o__Ilb	3,E-02	41	72	59	26	37	14	31	42	39	361
o__Ucm1571	4,E-02	32	89	60	14	24	20	41	30	46	356
o__envOPS12	4,E-02	55	53	79	62	30	21	12	7	36	355
o__Brocadiales	2,E-02	30	37	40	16	39	18	47	49	73	349
o__SBR1031	2,E-02	48	72	59	20	58	34	17	12	23	343
o__Pseudomonadales	4,E-02	53	25	41	52	37	60	8	6	29	311
o__PHOS-HD29	3,E-02	125	87	39	15	2	7	12	0	7	294
o__Aquificales	1,E-03	8	14	22	39	50	42	32	29	29	265
o__Coriobacteriales	3,E-03	11	4	9	59	49	49	14	39	21	255
o__Kordiimonadales	5,E-03	20	12	17	14	24	3	45	39	66	240
o__S-70	2,E-02	18	15	12	13	20	22	27	47	54	228
o__SM1D11	3,E-02	46	61	16	8	10	1	8	3	12	165
o__Thiobacterales	3,E-02	50	16	67	9	9	12	0	0	0	163
o__S1198	7,E-03	44	39	27	19	7	7	9	2	2	156
o__RB046	1,E-02	9	4	12	30	29	32	12	22	3	153
o__Caulobacterales	4,E-02	82	32	32	0	0	0	1	0	1	148
o__[Acetothermales]	2,E-04	0	0	2	8	0	2	49	37	37	135
o__MVS-107	2,E-03	22	23	30	14	15	9	4	9	4	130
o__Blg18	8,E-03	0	5	3	47	20	24	1	0	3	103
o__Opitutales	3,E-04	15	18	20	6	7	11	0	2	4	83
o__[Leptospirales]	2,E-02	33	17	15	1	1	2	4	2	3	78
o__[Cerasicoccales]	2,E-02	13	11	15	6	7	0	5	7	5	69
o__d153	2,E-03	14	26	14	3	4	0	0	0	2	63
o__MD2894-B20	2,E-02	0	0	5	12	24	11	4	4	3	63
o__Gemmatimonadales	4,E-02	12	38	10	1	0	0	0	0	0	61
o__FAC88	1,E-02	18	14	14	1	0	0	11	0	1	59
o__B07_WMSP1	5,E-03	8	15	9	11	8	5	0	0	1	57
o__mle1-8	2,E-03	6	7	4	0	3	1	9	13	12	55
o__Enterobacterales	1,E-02	10	12	7	7	3	6	1	2	4	52
o__Lactobacillales	7,E-03	8	9	11	4	1	5	4	3	6	51
o__Desulfurellales	3,E-02	3	1	0	3	6	10	9	10	8	50

Tabla Anexo C-4: Grupos taxonómicos a nivel de familia con diferencias significativas entre los niveles de salinidad, valores de ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).

Familia	p-values	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	Total
f__Piscirickettsiaceae	2,E-04	2717	3215	3019	2866	3025	2409	4579	4577	4871	31278
f__koll13	2,E-03	1981	2127	1379	4618	4154	6023	2408	2006	2591	27287
f__Ectothiorhodospiraceae	3,E-05	393	550	612	1241	1236	1263	3832	4512	4335	17974
f__Hyphomicrobiaceae	2,E-03	1540	1578	2087	2172	2225	2883	1098	737	1055	15375
f__NB1-i	3,E-03	361	407	712	1236	1585	1373	1650	2544	2432	12300
f__[Marinicellaceae]	1,E-02	1328	2299	1154	780	747	699	379	404	692	8482
f__Rhodobacteraceae	2,E-04	1640	2262	1726	836	417	349	169	214	460	8073
f__Flammeovirgaceae	3,E-03	1153	1177	881	422	484	262	150	251	489	5269
f__[Enttheonellaceae]	4,E-02	356	767	874	583	514	638	307	240	388	4667
f__Caldilineaceae	9,E-03	843	658	586	696	737	499	219	175	175	4588
f__Nitrospiraceae	3,E-03	116	120	413	249	358	167	952	807	746	3928
f__Nitriliruptoraceae	1,E-02	235	199	241	827	409	898	213	181	233	3436
f__HTCC2089	3,E-03	428	434	524	389	350	279	145	133	290	2972
f__Gemmataceae	1,E-03	287	204	236	492	444	472	257	208	176	2776
f__Haliangiaceae	5,E-03	372	346	326	309	343	355	208	177	216	2652
f__Methylocystaceae	2,E-03	368	488	684	285	174	168	61	81	65	2374
f__Rhodocyclaceae	6,E-06	525	761	578	74	98	67	9	10	10	2132
f__Desulfobacteraceae	5,E-03	121	190	213	343	297	262	245	187	239	2097
f__Rhizobiaceae	3,E-02	657	350	376	134	71	58	72	111	229	2058
f__EB1017	3,E-02	161	84	157	240	489	354	195	135	149	1964
f__C111	4,E-03	417	418	272	224	176	215	34	100	74	1930
f__BA059	5,E-03	10	15	161	120	193	238	301	349	375	1762
f__Acetobacteraceae	3,E-02	72	93	85	214	210	393	239	193	169	1668
f__MND4	2,E-04	58	10	39	116	103	86	319	435	470	1636
f__RB40	3,E-03	205	288	234	195	187	157	135	118	83	1602
f__Sphingomonadaceae	3,E-02	562	266	288	143	48	47	7	20	8	1389
f__Desulfuromonadaceae	3,E-02	187	166	225	118	52	66	179	86	152	1231
f__Nannocystaceae	6,E-04	172	203	190	146	108	138	90	87	70	1204
f__JTB38	3,E-02	75	78	141	109	48	68	128	211	261	1119

f__Bdellovibrionaceae	4,E-03	232	270	173	129	56	65	64	52	64	1105
f__Micromonosporaceae	1,E-02	127	100	115	169	158	310	24	6	24	1033
f__Thermoanaerobactera ceae	6,E-03	18	28	34	91	127	94	137	153	99	781
f__Methylococcaceae	2,E-03	11	9	36	78	79	38	138	202	167	758
f__Ignavibacteriaceae	1,E-02	172	88	231	64	56	70	0	7	28	716
f__Chitinophagaceae	3,E-02	204	93	162	50	39	27	25	54	53	707
f__Pseudonocardiaceae	8,E-04	36	4	33	141	188	238	17	16	21	694
f__Sphingobacteriaceae	2,E-02	281	181	117	42	13	26	8	3	17	688
f__Geodermatophilaceae	2,E-03	99	92	73	111	75	99	14	21	29	613
f__4-29	9,E-03	0	0	0	57	94	25	182	111	103	572
f__Ruminococcaceae	6,E-03	52	22	35	118	89	137	60	23	32	568
f__Xanthomonadaceae	5,E-03	75	141	104	12	9	10	84	32	95	562
f__Bacteriovoraceae	1,E-02	80	150	77	38	6	15	31	30	52	479
f__Verrucomicrobiaceae	4,E-03	115	85	104	29	28	19	7	20	53	460
f__CV106	5,E-03	5	22	24	70	38	35	67	68	101	430
f__Marinilabiaceae	2,E-02	157	64	110	20	12	3	6	11	15	398
f__Koribacteraceae	5,E-04	120	113	83	12	12	12	7	1	9	369
f__wb1_P06	4,E-02	43	19	18	54	54	74	31	41	35	369
f__Comamonadaceae	1,E-02	121	46	138	19	20	12	6	0	5	367
f__Halanaerobiaceae	8,E-04	6	2	6	46	38	60	71	69	57	355
f__Brocadiaceae	2,E-02	30	37	40	16	38	18	47	49	73	348
f__HTCC2188	2,E-04	66	69	95	16	9	4	15	18	26	318
f__SB-1	2,E-02	137	37	129	1	0	0	0	0	2	306
f__R4-41B	4,E-02	80	44	46	23	24	25	7	8	26	283
f__Thermomonosporacea e	3,E-03	22	17	45	51	55	56	17	5	12	280
f__Rickettsiaceae	1,E-02	24	37	40	5	0	5	64	59	29	263
f__Desulfohalobiaceae	7,E-03	7	3	14	45	20	33	39	51	46	258
f__Coriobacteriaceae	3,E-03	11	4	9	59	49	49	14	39	21	255
f__Pseudomonadaceae	2,E-02	35	13	35	48	36	51	5	4	23	250
f__Kordiimonadaceae	5,E-03	20	12	17	14	24	3	45	39	66	240
f__ZA3409c	2,E-03	28	57	46	36	22	36	2	3	7	237
f__Xanthobacteraceae	3,E-02	15	33	18	62	35	30	13	14	13	233
f__Alicyclobacillaceae	3,E-02	66	36	38	18	22	12	9	5	8	214
f__MVS-65	5,E-03	40	20	29	33	39	44	1	3	4	213
f__NS11-12	3,E-02	74	46	31	15	7	19	7	6	6	211
f__Beijerinckiaceae	3,E-02	79	39	43	22	3	11	4	2	7	210
f__Thermoactinomyacetac eae	2,E-02	18	7	13	41	33	30	23	26	13	204
f__OPB35	6,E-03	35	30	40	19	22	37	4	5	8	200
f__Ellin6075	2,E-02	52	25	78	6	2	12	0	2	13	190

f__zEL20	6,E-03	1	4	9	33	42	68	3	13	3	176
f__Acidimicrobiaceae	9,E-05	8	11	3	42	42	32	8	7	10	163
f__Thiobacteraceae	3,E-02	49	16	67	8	9	12	0	0	0	161
f__Acidobacteriaceae	4,E-02	16	27	27	13	26	19	6	11	13	158
f__Hydrogenothermaceae	1,E-02	6	6	12	22	28	19	27	17	19	156
f__Caulobacteraceae	4,E-02	82	32	32	0	0	0	1	0	1	148
f__mb2424	3,E-02	53	20	36	18	7	4	0	1	0	139
f__125ds10	7,E-05	0	1	2	2	9	4	32	39	37	126
f__SUP05	1,E-03	2	5	4	11	2	6	26	17	27	100
f__AK1AB1_02E	9,E-03	30	22	19	10	2	8	0	2	7	100
f__Opitutaceae	3,E-04	15	18	20	6	7	11	0	2	4	83
f__[Chromatiaceae]	2,E-02	17	11	27	6	2	4	3	4	9	83
f__Desulfurobacteriaceae	3,E-03	2	6	4	15	19	15	5	9	2	77
f__Leptospiraceae	2,E-02	30	17	15	1	1	2	4	2	3	75
f__211ds20	1,E-02	20	13	19	7	1	2	1	2	9	74
f__[Cerasicoccaceae]	2,E-02	13	11	15	6	7	0	5	7	5	69
f__Gemmatimonadaceae	4,E-02	11	38	10	0	0	0	0	0	0	59
f__Enterobacteriaceae	1,E-02	10	12	7	7	3	6	1	2	4	52
f__Desulfurellaceae	3,E-02	3	1	0	3	6	10	9	10	8	50

Tabla Anexo C-5: Grupos taxonómicos a nivel de género con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).

Genero	p-valores	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	Lecturas
g__Rhodoplanes	4,E-03	1052	860	1521	1642	1627	2262	666	308	314	10252
g__Thioalkalivibrio	3,E-05	283	309	450	339	268	266	2300	2666	2456	9337
g__Roseospiillum	8,E-04	220	733	260	1312	1444	1602	1031	810	1097	8509
g__Oceanibaculum	2,E-02	870	872	1277	635	582	305	231	240	633	5645
g__Nitrospira	3,E-03	116	120	413	234	340	140	933	786	727	3809
g__Rhodovibrio	4,E-04	23	64	137	188	395	278	554	626	750	3015
g__Desulfomonas	1,E-02	361	747	397	133	139	165	213	94	124	2373
g__Methylosinus	2,E-03	321	432	609	259	169	164	42	63	59	2118
g__Thalassobacillus	4,E-02	166	141	72	294	359	660	84	59	244	2079

g__Marinobacter	2,E-02	103	83	138	90	112	90	410	252	739	2017
g__Azoarcus	2,E-05	489	742	530	65	73	48	3	3	3	1956
g__Phaselicystis	2,E-02	298	226	231	173	165	142	76	109	137	1557
g__Nitriliruptor	6,E-04	46	46	112	357	268	259	159	134	166	1547
g__Candidatus_Entotheonella	2,E-02	134	201	138	277	156	347	58	45	93	1449
g__Rhodobacter	1,E-02	188	424	300	162	129	52	25	43	124	1447
g__Aetherobacter	2,E-03	215	208	172	83	56	65	208	221	209	1437
g__Plesiocystis	6,E-04	166	198	187	145	106	132	90	86	69	1179
g__Rhodovulum	3,E-02	205	537	188	104	35	29	10	3	31	1142
g__Bdellovibrio	4,E-03	232	270	173	129	56	65	64	52	64	1105
g__Rhodovastum	5,E-02	7	25	18	135	137	308	199	148	87	1064
g__Flavobacterium	8,E-03	454	196	328	6	9	4	0	0	0	997
g__Lewinella	1,E-02	135	50	101	144	225	220	43	50	23	991
g__Piezobacter	5,E-03	116	205	188	70	93	49	25	34	90	870
g__Novosphingobium	2,E-02	344	181	171	100	30	20	6	12	2	866
g__Thiobacillus	4,E-02	38	73	75	120	136	97	72	116	96	823
g__Prostheco microbium	1,E-05	217	218	263	45	17	35	13	1	9	818
g__Clostridium	5,E-02	68	21	59	130	103	158	109	32	35	715
g__Desulfatibacillum	5,E-02	27	65	74	78	131	128	82	34	70	689
g__Maribius	5,E-03	168	185	112	74	6	50	1	20	34	650
g__Salegentibacter	1,E-02	261	94	231	2	1	6	0	1	1	597
g__Desulfotalea	2,E-02	3	8	10	97	24	48	118	75	203	586
g__Blastococcus	2,E-03	91	84	72	105	72	93	14	20	29	580
g__Balneatrix	2,E-05	8	27	12	135	135	147	50	34	20	568
g__Jiangella	2,E-03	4	0	1	128	124	219	15	8	13	512
g__Rubrimonas	1,E-02	201	192	73	17	10	10	0	0	1	504
g__Mesorhizobium	7,E-03	94	63	70	21	19	15	76	59	84	501
g__Rhodobiium	2,E-02	52	128	112	46	23	36	20	35	42	494
g__Methylococcus	1,E-03	9	5	12	24	45	29	98	149	120	491
g__Simiduia	4,E-02	97	114	75	30	30	24	22	6	91	489
g__Paenibacil	2,E-02	11	12	10	68	74	86	106	33	71	471

lus											
g__Thiorhodovibrio	3,E-02	18	34	19	53	70	77	53	43	102	469
g__Solitalea	4,E-02	143	100	42	40	13	21	4	2	10	375
g__Micromonospora	3,E-03	96	85	64	32	47	25	8	2	7	366
g__Oceanicella	4,E-03	47	78	47	44	45	50	17	10	27	365
g__Caldimicrobium	2,E-02	11	44	14	17	38	10	101	64	60	359
g__Gaiella	5,E-02	53	25	30	47	55	108	10	8	13	349
g__Pedomicrobium	1,E-02	8	5	27	47	149	112	0	0	0	348
g__Dinoroseobacter	9,E-03	61	84	133	52	2	9	0	3	1	345
g__HTCC	2,E-04	66	69	95	16	9	4	15	18	26	318
g__Geosporobacter_Thermotalea	1,E-02	17	2	16	43	63	87	29	14	5	276
g__Carboxydothermus	2,E-02	5	7	11	39	67	49	36	44	15	273
g__Gemmata	1,E-02	29	10	39	37	55	76	5	9	4	264
g__Kuenenia	4,E-03	23	37	29	10	22	6	36	39	53	255
g__Pedobacter	2,E-02	126	59	60	2	0	3	0	0	2	252
g__Halothermothrix	5,E-04	2	2	2	24	19	29	52	62	48	240
g__Desulforubis	9,E-03	5	4	8	28	23	17	60	59	32	236
g__Cryptoprodotis	1,E-02	17	27	31	1	0	5	62	57	26	226
g__Fluviicola	3,E-06	49	63	52	13	13	8	7	7	11	223
g__mixed	4,E-02	12	12	7	21	29	44	36	33	25	219
g__Chelativorans	3,E-02	21	50	48	23	13	11	16	17	18	217
g__Alicyclobacillus	3,E-02	66	36	38	18	22	12	9	5	8	214
g__Thalassobaculum	2,E-06	46	55	52	6	7	7	5	13	10	201
g__Parasegibacter	3,E-02	45	48	31	12	2	7	4	34	16	199
g__Blastochloris	2,E-02	7	21	10	60	35	28	13	10	13	197
g__Bacteriovorax	3,E-02	21	62	42	15	4	5	12	9	26	196
g__Kordiimonas	2,E-04	11	10	6	9	6	2	45	38	65	192
g__Anaerobacillus	8,E-03	11	2	5	33	38	32	23	11	37	192
g__Actinomadura	2,E-05	13	14	17	39	36	41	11	3	7	181
g__Singulisphaera	1,E-03	4	5	5	10	12	9	54	28	52	179
g__Olsenella	2,E-05	8	3	3	53	43	41	4	4	1	160

g__Serpens	3,E-03	0	1	17	43	31	50	1	1	15	159
g__Sphingomonas	9,E-03	55	25	55	10	2	2	1	8	0	158
g__Ammonifex	6,E-03	5	10	11	15	24	17	20	22	28	152
g__Rhodanobacter	5,E-02	13	85	42	3	0	5	0	0	1	149
g__Methylophaga	1,E-02	50	24	41	19	2	4	1	0	3	144
g__Amaricoccus	5,E-02	49	44	14	9	9	1	0	6	12	144
g__Maricaulis	2,E-03	1	4	5	31	25	28	19	5	20	138
g__Phenylobacterium	4,E-02	77	30	30	0	0	0	0	0	0	137
g__Acidimicrobium	2,E-03	8	7	3	26	42	28	5	7	5	131
g__BD2-6	2,E-02	1	1	7	9	0	2	49	12	46	127
g__Ilumatobacter	5,E-02	33	21	18	16	7	19	1	7	4	126
g__Peredibacter	1,E-02	23	31	18	7	1	5	8	19	13	125
g__Haloplasma	2,E-02	22	3	9	22	26	31	6	2	0	121
g__Methylophaga	1,E-02	20	22	20	5	7	11	7	6	18	116
g__Desulfonuticus	9,E-04	3	1	5	12	12	13	19	26	22	113
g__Persephonella	1,E-03	4	4	9	15	15	13	16	14	15	105
g__Cytophaga	2,E-02	36	15	30	11	0	3	3	1	4	103
g__Marinilabilia	5,E-02	6	36	34	2	3	0	3	9	7	100
g__Halobacillus	4,E-02	6	12	11	10	25	22	2	1	10	99
g__Belliella	1,E-02	18	26	17	11	2	2	1	7	11	95
g__Ruthia	2,E-03	1	3	4	10	2	5	26	15	27	93
g__Desulfocapsa	4,E-02	6	10	6	4	7	3	25	11	15	87
g__Photobacterium	1,E-02	12	27	44	0	0	0	3	0	0	86
g__Opitutus	3,E-04	15	18	20	6	7	11	0	2	4	83
g__Rhodomicrobium	8,E-03	17	16	30	3	1	10	3	2	1	83
g__Halocella	2,E-02	3	0	2	20	11	21	13	2	1	73
g__Angiococcus	8,E-03	29	15	19	3	1	0	1	2	1	71
g__Thermanaeromonas	3,E-03	1	5	1	4	3	6	16	14	11	61
g__Gemmatimonas	4,E-02	11	38	10	0	0	0	0	0	0	59
g__Algoriphagus	1,E-02	9	13	11	7	3	6	1	6	2	58
g__MSBL3	1,E-02	20	8	24	3	0	1	0	0	0	56
g__Craurococcus	1,E-02	17	10	13	7	1	2	2	2	2	56

cus											
g__Muricola	4,E-02	16	5	25	3	0	4	0	1	1	55
g__Deffluviobacter	5,E-02	7	23	10	1	1	5	3	4	0	54
g__Roseicyclus	2,E-04	12	14	17	5	0	2	0	0	1	51
g__Cecembia	2,E-04	1	6	1	12	16	15	0	0	0	51
g__Hippea	3,E-02	3	1	0	3	6	10	9	10	8	50
g__Cellulosibacter	2,E-04	1	1	1	12	11	15	4	3	1	49
g__Caloramator	1,E-02	3	0	2	14	12	10	8	0	0	49
g__Roseibacillus	1,E-02	7	8	12	7	2	6	1	1	3	47
g__Rubritalea	2,E-02	23	14	8	2	0	0	0	0	0	47
g__Dethiosulfovibrio	5,E-02	1	7	5	2	2	3	12	5	10	47
g__Woodsholea	1,E-04	17	16	13	0	0	0	0	0	0	46
g__Turneriella	1,E-03	13	14	8	1	1	1	1	2	2	43
g__Parvopolyospora	4,E-03	1	2	7	8	11	10	1	1	2	43

Tabla Anexo C-6: Grupos taxonómicos a nivel de especie con diferencias significativas entre los niveles de salinidad ($p < 0,05$) y número de secuencias en cada grupo taxonómico. Salinidad baja (1A, 1B, 1C), Salinidad media (2A, 2B, 2C) y salinidad alta (3A, 3B y 3C).

Especie	p-values	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	Total lecturas
s__parvum	8,E-04	220	733	260	1312	1444	1602	1031	810	1097	8509
s__thiocyanodinitrificans_A RhD_1	1,E-05	112	134	202	168	129	117	1654	1829	1681	6026
s__indicum	2,E-02	870	872	1277	635	582	305	231	240	633	5645
s__briensis	4,E-02	31	15	565	483	1136	1010	229	293	393	4155
s__calida	4,E-04	6	0	130	110	257	78	915	770	695	2961
s__sulfidophilus	1,E-04	141	133	226	123	118	114	604	767	711	2937
s__alkaliphilus	1,E-03	88	55	181	417	315	357	245	232	228	2118
s__sporum	2,E-03	314	427	605	258	165	157	42	62	59	2089
s__michiganensis	7,E-03	335	667	359	110	118	143	168	71	70	2041
s__indigens	3,E-05	453	736	528	65	71	48	3	3	3	1910

s__thermophilus	5,E-02	198	699	312	113	126	71	56	50	116	1741
s__flava	1,E-02	302	232	244	177	166	143	77	110	140	1591
s__fasciculatus	2,E-03	215	208	172	83	56	65	208	221	209	1437
s__atsumiense	5,E-02	7	25	18	135	137	308	199	148	87	1064
s__nigricans	9,E-03	130	48	100	144	225	220	43	50	23	983
s__multiformis	1,E-05	196	289	219	47	58	40	7	4	17	877
s__pneumaticum	1,E-05	217	218	263	45	17	35	13	1	9	818
s__mashuensis	3,E-02	18	77	18	336	167	107	28	8	4	763
s__alkenivora	5,E-02	27	65	74	78	131	128	82	34	70	689
s__salinus	5,E-03	168	185	114	74	7	51	1	20	36	656
s__alpica	2,E-05	8	27	12	135	135	147	50	34	20	568
s__cliftonensis	1,E-02	201	192	73	17	10	10	0	0	1	504
s__defluvii	7,E-03	8	18	18	37	7	20	68	148	170	494
s__orientis	2,E-02	50	125	108	46	23	36	20	35	42	485
s__winogradskyi	3,E-02	18	34	19	53	70	77	53	43	102	469
s__alhagi	1,E-02	86	52	61	18	18	15	71	57	82	460
s__agarivorans	2,E-02	94	109	72	27	17	12	17	5	81	434
s__capsulatus	3,E-03	8	5	11	21	34	27	73	135	112	426
s__DDSW3008	3,E-03	15	21	35	29	43	22	64	80	112	421
s__nitrogenifigens	2,E-02	177	84	85	7	10	13	4	7	0	387
s__actignis	4,E-03	47	78	47	44	45	50	17	10	27	365
s__rimae	2,E-02	11	44	14	17	38	10	101	64	60	359
s__occulta	5,E-02	53	25	30	47	55	108	10	8	13	349
s__oxamicus	2,E-03	19	25	18	53	45	65	35	37	37	334
s__spumosum	4,E-02	120	69	51	22	10	12	13	15	21	333
s__fluminis	5,E-02	107	68	41	32	14	28	4	13	13	320
s__saxobside	4,E-02	74	63	35	69	32	21	1	0	3	298
s__kostiense	2,E-02	7	3	4	12	3	5	40	60	138	272
s__vinacea	2,E-02	24	32	31	37	37	45	8	15	33	262
s__limicola	3,E-02	8	3	15	72	91	25	16	14	18	262
s__stuttgartiensis	4,E-03	23	37	29	10	22	6	36	39	53	255
s__orenii	5,E-04	2	2	2	24	19	29	52	62	48	240
s__audaxviator	9,E-03	5	4	8	28	23	17	60	59	32	236
s__polytropus	1,E-02	17	27	31	1	0	5	62	57	26	226
s__culture_iso	4,E-02	12	12	7	21	29	44	36	33	25	219

late_koll13											
s__vacuolata	3,E-02	44	61	22	18	16	11	17	8	14	211
s__rosea	2,E-03	7	13	9	12	16	13	55	29	54	208
s__endophyticus	2,E-04	0	0	2	60	44	69	10	1	13	199
s__luojiensis	3,E-02	45	48	31	12	2	7	4	34	16	199
s__litoreum	2,E-07	46	54	52	5	6	6	5	10	10	194
s__alaskensis	1,E-02	5	5	11	15	10	17	32	30	69	194
s__gwangyanensis	2,E-04	11	10	6	9	6	2	45	38	65	192
s__thermophilum	5,E-02	17	22	22	29	19	36	8	14	19	186
s__DWL312	3,E-02	62	47	25	28	8	8	3	1	1	183
s__nagasakiensis	4,E-02	15	12	2	63	36	22	13	6	12	181
s__thermosuccinogenes	4,E-03	11	0	7	51	30	64	8	5	4	180
s__siderophilus	2,E-02	1	1	5	31	50	26	19	27	9	169
s__flexibilis	3,E-03	0	1	17	43	31	50	1	1	15	159
s__ishimotonii	1,E-02	19	28	18	6	8	12	17	22	27	157
s__spathiphyllii	5,E-02	13	85	42	3	0	5	0	0	1	149
s__aurea	2,E-02	46	22	38	19	1	3	1	0	3	133
s__profusa	2,E-05	3	0	2	47	41	34	2	2	0	131
s__aquatica	5,E-03	2	14	1	21	24	26	11	15	14	128
s__starrii	1,E-02	23	31	18	7	1	5	8	19	13	125
s__contractile	2,E-02	22	3	9	22	26	31	6	2	0	121
s__thiophilus	7,E-03	4	7	6	14	23	14	16	15	21	120
s__alba	3,E-04	9	5	10	21	24	26	8	4	7	114
s__autotrophicus	9,E-04	3	1	5	12	12	13	19	26	22	113
s__radioresistens	3,E-02	18	17	14	15	13	13	10	2	10	112
s__birminghamensis	8,E-03	16	18	23	10	5	8	5	8	14	107
s__orale	5,E-02	32	9	34	3	2	7	6	8	6	107
s__longiquaesitum	2,E-02	20	15	5	19	18	21	5	0	0	103
s__pacifica	2,E-02	37	19	23	7	2	2	1	4	6	101
s__salmonicolor	5,E-02	6	36	34	2	3	0	3	9	7	100
s__fusiforme	2,E-02	16	14	12	15	11	16	7	6	1	98
s__buswellii	1,E-04	18	25	24	6	2	5	8	2	6	96
s__maritima	4,E-02	20	17	13	3	6	10	9	10	8	96
s__magnifica	2,E-03	1	3	4	10	2	5	26	15	27	93
s__pelovolcan	2,E-02	18	25	16	11	2	1	1	7	11	92

i											
s__xylanolytica	2,E-02	33	15	21	9	0	3	3	1	4	89
s__thermotolerans	2,E-02	3	3	2	6	16	11	19	12	14	86
s__vannielii	8,E-03	17	16	30	3	1	10	3	2	1	83
s__massiliensis	5,E-04	15	16	14	2	4	5	9	6	7	78
s__wittichii	1,E-02	31	15	22	9	0	0	0	0	0	77
s__thiozymogenes	2,E-02	4	7	4	3	7	3	23	10	15	76
s__hydrogeniformans	3,E-02	2	5	6	8	17	23	5	5	3	74
s__cellulolysilytica	2,E-02	3	0	2	20	11	21	13	2	1	73
s__disciformis	8,E-03	29	15	19	3	1	0	1	2	1	71
s__succinicans	4,E-02	35	10	17	0	0	0	0	0	0	62
s__toyohensis	3,E-03	1	5	1	4	3	6	16	14	11	61
s__insigne	4,E-03	0	7	4	2	1	1	15	17	11	58
s__roseus	1,E-02	17	10	13	7	1	2	2	2	2	56
s__bisanense	3,E-02	8	6	5	4	1	3	6	10	13	56
s__cellulosilyticus	3,E-02	0	0	1	21	6	18	8	0	0	54
s__dokdonensis	4,E-05	16	14	16	2	1	1	0	0	1	51
s__mahoneyensis	2,E-04	12	14	17	5	0	2	0	0	1	51
s__lonarensis	2,E-04	1	6	1	12	16	15	0	0	0	51
s__alkalithermophilus	2,E-04	1	1	1	12	11	15	4	3	1	49
s__mangrovi	4,E-02	14	12	6	2	9	3	0	0	2	48
s__ilicicola	4,E-02	7	10	9	1	0	1	6	1	12	47
s__phoceae	1,E-03	2	4	2	4	3	3	7	7	11	43
s__pallida	4,E-03	1	2	7	8	11	10	1	1	2	43
s__loti	1,E-03	8	10	9	3	1	0	5	2	2	40
s__africana	4,E-02	11	6	9	4	5	0	1	0	4	40

Bibliografía

- Abraham, T. J., Ghosh, S., Nagesh, T. S., & Sasml, D. (2004). Related information in other data sources Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. *Aquaculture*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300974500>
- Alauzet, C., & Jumas-Bilak, E. (2014). The phylum Deferribacteres and the genus *Caldithrix*. *The Prokaryotes*. Retrieved from http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38954-2_162
- Allakhverdiev, S., & Murata, N. (2008). Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s11120-008-9334-x>
- Alongi, D. M. (Daniel M. . (2009). *The Energetics of Mangrove Forests*. Springer Netherlands.
- Alongi, D. M. (2014). Carbon Cycling and Storage in Mangrove Forests. *Annual Review of Marine Science*, 6(1), 195–219. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135020>
- Alongi, D. M. (2008). Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.024>
- Alzubaidy, H., Essack, M., Malas, T. B., Bokhari, A., Motwalli, O., Kamanu, F. K., ... Archer, J. A. C. (2015). Rhizosphere microbiome metagenomics of gray mangroves (*Avicennia marina*) in the Red Sea. *Gene*, 576(2), 626–636. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.032>
- Amils, R. (2011). Euryarchaeota. *Encyclopedia of Astrobiology*. Retrieved from http://link.springer.com/10.1007%2F978-3-642-11274-4_541
- Andreote, F., Jiménez, D., Chaves, D., & Dias, A. (2012). The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PLoS*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0038600>
- Andreote, F. D., Jiménez, D. J., Chaves, D., Dias, A. C. F., Luvizotto, D. M., Dini-Andreote, F., ... de Melo, I. S. (2012). The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PloS One*, 7(6), e38600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038600>
- Andronov, E., Petrova, S., Pinaev, A., & Pershina, E. (2012). Analysis of the structure of microbial community in soils with different degrees of salinization using T-RFLP and real-time PCR techniques. *Eurasian Soil*. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/DJ140QJ17R10051R.pdf>
- Aponte, C., Matías, L., González-Rodríguez, V., & Castro, J. (2014). Soil nutrients and microbial biomass in three contrasting Mediterranean forests. *Plant and Soil*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s11104-014-2061-5>

- Auclair, J., Lépine, F., Parent, S., & Villemur, R. (2010). Dissimilatory reduction of nitrate in seawater by a Methylophaga strain containing two highly divergent narG sequences. *The ISME Journal*. Retrieved from <http://search.proquest.com/openview/f5ec611b93bcc2e0e3cc6dc17b7929e6/1?pq-origsite=gscholar&cbl=536304>
- Bai, S., Li, J., He, Z., Nostrand, J. Van, Tian, Y., & Lin, G. (2013). GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of soil microbial communities of mangroves. *Applied Microbiology*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4496-z>
- Baldani, J., Videira, S., & Teixeira, K. dos S. (2014). The family rhodospirillaceae. *The Prokaryotes*. Retrieved from http://link.springer.com/10.1007%2F978-3-642-30197-1_300
- Barka, E., Vatsa, P., & Sanchez, L. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and*. Retrieved from <http://mmbr.asm.org/content/80/1/1.short>
- Basak, P., Pramanik, A., Sengupta, S., & Nag, S. (2016). Bacterial diversity assessment of pristine mangrove microbial community from Dhulibhashani, Sundarbans using 16S rRNA gene tag sequencing. *Genomics Data*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213596015301008>
- Bashan, Y., & Holguin, G. (2002). Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees*, 16(2–3), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00468-001-0152-4>
- Bashir, A., Hoffmann, T., & Smits, S. (2014). Dimethylglycine provides salt and temperature stress protection to *Bacillus subtilis*. *Applied and*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/80/9/2773.short>
- Behera, B., Singdevsachan, S., & Mishra, R. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818113001096>
- Berben, T., Overmars, L., & Sorokin, D. (2017). Comparative genome analysis of three thiocyanate oxidizing Thioalkalivibrio species isolated from Soda Lakes. *Frontiers in*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328954/>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Bhattacharyya, A., Majumder, N., Basak, P., & Mukherji, S. (2015). Diversity and distribution of Archaea in the mangrove sediment of Sundarbans. *Archaea*. Retrieved from <https://www.hindawi.com/journals/archaea/2015/968582/abs/>
- Bioinformatics, B. (2011). FastQC A quality control tool for high throughput sequence data. *Cambridge, UK: Babraham Institute*.
- Bond, P., Hugenholtz, P., & Keller, J. (1995). Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Applied and*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/61/5/1910.short>
- Bonder, M., Abeln, S., Zaura, E., & Brandt, B. (2012). Comparing clustering and pre-processing in taxonomy analysis. *Bioinformatics*. Retrieved from <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/22/2891.short>
- Bowman, J. (2006). The marine clade of the family flavobacteriaceae: the genera Aequorivita, Arenibacter, Cellulophaga, Croceibacter, Formosa, Gelidibacter, Gillisia, Maribacter,. *The Prokaryotes*. Retrieved from http://link.springer.com/10.1007/0-387-30747-8_26

- Bremer, E. (2002). Adaptation to Changing Osmolanty. *Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives*. Retrieved from <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817992.chap27>
- Brenner, D., Krieg, N., & Staley, J. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria Part A, Introductory Assays. Ed.
- Brock, T. D., & Madigan, M. T. 1949-. (2015). *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación.
- Bronick, C., & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706104000898>
- Bruijn, F. (2016). Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria. Retrieved from <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/2179819>
- Burgsdorf, I., Erwin, P., López-Legentil, S., & Cerrano, C. (2014). Biogeography rather than association with cyanobacteria structures symbiotic microbial communities in the marine sponge *Petrosia ficiformis*. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=AdJnCwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA7&dq=Biogeography+rather+than+association+with+cyanobacteria+structures+symbiotic+microbial+communities+in+the+marine+sponge+Petrosia+ficiformis&ots=BDv6Gz2rIX&sig=EU_Jg_RPwhaP1dQ4W6hjt_z-UA
- Canfora, L., Bacci, G., Pinzari, F., Papa, G., & Dazzi, C. (2014). Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil? *PloS One*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106662>
- Chaparro, J., Badri, D., & Vivanco, J. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3960538/>
- Chau, J., Bagtzoglou, A., & Willig, M. (2011). The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. *Environmental Forensics*. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15275922.2011.622348>
- Chen, M., Wei, H., Cao, J., Liu, R., Wang, Y., & Zheng, C. (2007). Expression of *Bacillus subtilis* proBA genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in. *BMB Reports*. Retrieved from http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=E1MBB7_2007_v40n3_396
- Chen, M., Sheu, S., & James, E. (2013). *Azoarcus* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Of Systematic and* Retrieved from <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.050609-0>
- Cheng, Z., Pan, J., Tang, W., Chen, Q., & Lin, Y. (2009). Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. *Journal of Forestry Research*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s11676-009-0012-4>
- Cho, S., Kim, M., & Lee, Y. (2016). Effect of pH on soil bacterial diversity. *Journal of Ecology and Environment*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1186/s41610-016-0004-1>
- Couto, G., Glogauer, A., Faoro, H., & Chubatsu, L. (2010). Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. *Genet Mol.* Retrieved from http://www.academia.edu/download/44887376/Isolation_of_a_novel_lipase_from_a_metag20160419-19960-txlctt.pdf

- Criminger, J., Hazen, T., & Sobecky, P. (2007). Nitrogen fixation by *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for a new ecological niche. *Applied and Environmental Microbiology*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/73/18/5959.short>
- Daims, H., Lebedeva, E., Pjevac, P., Han, P., & Herbold, C. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5152751/>
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews. Microbiology*. Retrieved from <http://search.proquest.com/openview/b50d896c6bc05c4302894181ed34c756/1?pq-origsite=gscholar&cbl=27584>
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 470–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1160>
- Das, P., Kumar Behera, B., Kumar Meena, D., Afrin Azmi, S., Chatterjee, S., Meena, K., & Prakash Sharma, A. (2015). Salt stress tolerant genes in halophilic and halotolerant bacteria: Paradigm for salt stress adaptation and osmoprotection. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 4(1), 642–658.
- Davis, K., Joseph, S., & Janssen, P. (2005). Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/71/2/826.short>
- Day, J. W. (2012). *Estuarine ecology*. Wiley-Blackwell.
- DeBruyn, J., Nixon, L., & Fawaz, M. (2011). Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/77/17/6295.short>
- Dias, A., Andreote, F., & Dini-Andreote, F. (2009). Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. *World Journal of Microbiology*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-009-0013-7>
- Dillon, J., McMath, L., & Trout, A. (2009). Seasonal changes in bacterial diversity in the Salton Sea. *Hydrobiologia*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s10750-009-9827-4>
- Dobson, S., James, S., & Franzmann, P. (1991). A numerical taxonomic study of some pigmented bacteria isolated from Organic Lake, an Antarctic hypersaline lake. *Archives of Microbiology*. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/T1P1XL6111W6W024.pdf>
- Docherty, K., Borton, H., Espinosa, N., & Gebhardt, M. (2015). Key edaphic properties largely explain temporal and geographic variation in soil microbial communities across four biomes. *PloS One*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0135352>
- Doronina, N., Darmaeva, T., & Trotsenko, Y. (2003). *Methylophaga natronica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from soda lake of the Southern. *Systematic and Applied Microbiology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004702015>
- Dworkin, M. (2006). The Prokaryotes: Vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=sTsC65kCJbUC&oi=fnd&pg=PR6&dq=The+Prokaryotes:+Vol.+5:+Proteobacteria:+Alpha+and+Beta+Subclasses&ots=9rc2qmxRlj&sig=IHW-QAMHN-cZOxRtLcGwHM7HvjU>
- Edgar, R., Haas, B., Clemente, J., & Quince, C. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Applied and Environmental Microbiology*. Retrieved from <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/27/16/2194.short>
- Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., & Lugtenberg, B. (2007). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the

- rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*, 0(0), 070816220133002-??? <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01424.x>
- Emerson, D., Rentz, J., Lilburn, T., Davis, R., & Aldrich, H. (2007). A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PloS One*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000667>
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016). Propiedades Químicas | FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Retrieved June 1, 2017, from <http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/propiedades-del-suelo/propiedades-quimicas/es/>
- Feller, I. C. (2002). The role of herbivory by wood-boring insects in mangrove ecosystems in Belize. *Oikos*, 97(2), 167–176. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.970202.x>
- Ferriol, M., & Merle, H. (2012). Los componentes alfa, beta y gamma de la biodiversidad. *Aplicación Al Estudio de Comunidades Vegetales*. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?q=ferriol+2012+Los+componentes+alfa%2C+beta+y+gamma+de+la+biodiversidad&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5
- Fierer, N., & Jackson, R. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Of the National Academy of Sciences* Retrieved from <http://www.pnas.org/content/103/3/626.short>
- Fuerst, J., Webb, R., Niftrik, L. van, & Jetten, M. (2006). Anammoxosomes of anaerobic ammonium-oxidizing planctomycetes. *Intracellular Structures in* Retrieved from http://link.springer.com/10.1007/7171_028
- Fukunaga, Y., Kurahashi, M., & Sakiyama, Y. (2009). Phycisphaera mikurensis gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of Phycisphaeraceae fam. nov., Phycisphaerales ord. nov. and Phycisphaerae. *The Journal of General*. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/55/4/55_4_267/_article/-char/ja/
- Galinski, E. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065291108601484>
- Garrity, G., Staley, J., Boone, D., & Vos, P. De. (2006). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=dgejA4wa5R4C&oi=fnd&pg=PR27&dq=Bergey%27s+Manual%20of+Systematic+Bacteriology:+Volume+Two:+The+Proteobacteria.+garrity+2006&ots=cX4TBKuLhm&sig=rlpCIJs1okJzxjllWSEtWwebKV0>
- Garrity, G., Bell, J., & Lilburn, T. (2005). Order VIII. Oceanospirillales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Ghizelini, A., & Mendonça-Hagler, L. (2012). Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments: a mini review. *Brazilian Journal of*. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822012000400002&script=sci_arttext&tlng=es
- Ghosh, A., Dey, N., Bera, A., Tiwari, A., Sathyaniranjan, K., Chakrabarti, K., & Chattopadhyay, D. (2010). Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. *Saline Systems*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-6-1>
- Gil-Torres, W., Fonseca, G., Restrepo, J., & Figueroa, P. (2009). Ordenamiento ambiental de los manglares de la Alta. *Media Y Baja Guajira*.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>

- Glick, B. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131300150X>
- Goldman, E., & Green, L. (2015). Practical handbook of microbiology. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?q=Goldman+Green%2C+2015&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5
- Gołębiewski, M., Deja-Sikora, E., Cichosz, M., & Tretyn, A. (2014). 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microbial Ecology*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00248-013-0344-7>
- Gomes, N., Cleary, D., Pinto, F., & Egas, C. (2010). Taking root: enduring effect of rhizosphere bacterial colonization in mangroves. *PLoS*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014065>
- Gomes, N. C., Cleary, D. F., Calado, R., & Costa, R. (2011). Mangrove bacterial richness. *Communicative & Integrative Biology*, 4(4), 419–23. <https://doi.org/10.4161/cib.4.4.15253>
- Goodfellow, M., & Williams, S. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*. Retrieved from <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>
- Gotoh, O. (1982). An improved algorithm for matching biological sequences. *Journal of Molecular Biology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283682903989>
- Grant, W. (2006). Alkaline environments and biodiversity. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=RJ3EDAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA21&dq=Grant,+W.+D.+\(2006\).+Alkaline+environments+and+biodiversity+&ots=_7Dgn9pKol&sig=GNTcC18HtjvLw9JyQFrC_DoDnFg](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=RJ3EDAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA21&dq=Grant,+W.+D.+(2006).+Alkaline+environments+and+biodiversity+&ots=_7Dgn9pKol&sig=GNTcC18HtjvLw9JyQFrC_DoDnFg)
- Hanada, S., & Sekiguchi, Y. (2014). The phylum gemmatimonadetes. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of*. Retrieved from http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-642-38954-2_164.pdf
- Hao, S. D. C., Mu, J., Hu, W., & Xiao, P. (2016). Unearthing microbial diversity of Taxus rhizosphere via MiSeq high-throughput amplicon sequencing and isolate characterization. *Scientific Reports*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4832182/>
- Hassink, J. (1994). Effect of soil texture on the size of the microbial biomass and on the amount of C and N mineralized per unit of microbial biomass in Dutch grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071794901007>
- Hazen, T., Dubinsky, E., & DeSantis, T. (2010). Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/330/6001/204.short>
- Heijs, S., Laverman, A., & Forney, L. (2008). Comparison of deep-sea sediment microbial communities in the Eastern Mediterranean. *FEMS*. Retrieved from <http://femsec.oxfordjournals.org/content/64/3/362.abstract>
- Holguin, G., Bashan, Y., Mendoza Salgado, R. A., Amador Silva, E. S., Toledo, G., Vázquez Correa, P., & Amador Lucero, A. (1999). La microbiología de los manglares, bosques en la frontera entre el mar y la tierra. *Ciencia Y Desarrollo*, 25(144), 26–35. Retrieved from <http://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-y-desarrollo/articulo/la-microbiologia-de-los-manglares-bosques-en-la-frontera-entre-el-mar-y-la-tierra>
- Holguin, G., Vazquez, P., & Bashan, Y. (2001). The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an

- overview. *Biology and Fertility of Soils*, 33(4), 265–278. <https://doi.org/10.1007/s003740000319>
- Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(10), 1825–1831. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863261>
- Hossain, M., & Nuruddin, A. (2016). Soil and Mangrove: A Review. *Journal of Environmental Science*. Retrieved from <http://search.proquest.com/openview/f38a07f3f9d764b380b15c64da068cf7/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026760>
- Hu, T., Jiang, C., Liang, X., & Long, W. (2006). Cloning and diversity analysis of microorganism genes from alkalescence soil. *Yi Chuan Xue Hui Bian Ji*. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/17035189>
- Hugenholtz, P., Goebel, B., & Pace, N. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/180/18/4765.short>
- Hugenholtz, P., Goebel, B., & Pace, N. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/180/18/4765.short>
- Huse, S., Welch, D., & Morrison, H. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2010.02193.x/full>
- Imhoff, J. (2006). The family Ectothiorhodospiraceae. *The Prokaryotes*. Retrieved from http://link.springer.com/10.1007/0-387-30746-X_32
- Janssen, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1719–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>
- Jeanbille, M., Buée, M., Bach, C., Cébron, A., & Frey-Klett, P. (2016). Soil parameters drive the structure, diversity and metabolic potentials of the bacterial communities across temperate beech forest soil sequences. *Microbial Ecology*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00248-015-0669-5>
- Jeanbille, M., Buée, M., Bach, C., Cébron, A., & Frey-Klett, P. (2016). Soil parameters drive the structure, diversity and metabolic potentials of the bacterial communities across temperate beech forest soil sequences. *Microbial Ecology*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00248-015-0669-5>
- Jiang, X.-T., Peng, X., Deng, G.-H., Sheng, H.-F., Wang, Y., Zhou, H.-W., & Tam, N. F.-Y. (2013). Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland. *Microbial Ecology*, 66(1), 96–104. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0238-8>
- Jiménez, D., Dini-Andreote, F., & van Elsas, J. (2014). Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 92. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-92>
- Jr, M. (1993). Structure and physiological ecology of soil. *BF Meeting, Jr.(ed) Soil Microbial Ecology: Applications*. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?q=Metting+Jr%2C+F.+B.+%281993%29.+Structure+and+physiological+ecology+of+soil.+In+B.+F.+Meeting%2C+Jr.%28ed%29+Soil+Microbial+Ecology%3A+&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5
- Júnior, F. S., Dias, A., & Fasanella, C. (2013). Endo-and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment. *Brazilian Journal of*. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822013000300048&script=sci_arttext&lng=es

- Klähn, S., Höhne, A., & Simon, E. (2010). The gene ssl3076 encodes a protein mediating the salt-induced expression of ggpS for the biosynthesis of the compatible solute glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. *Journal of Bacteriology*. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/192/17/4403.short>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Koschorreck, M., Geller, W., & Neu, T. (2010). Structure and function of the microbial community in an in situ reactor to treat an acidic mine pit lake. *FEMS*. Retrieved from <http://femsec.oxfordjournals.org/content/73/2/385.abstract>
- Kouridaki, I., Polymenakou, P., & Tselepidis, A. (2010). Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the deep Northeastern Pacific Ocean: a comparison with the deep Eastern Mediterranean Sea. *International*. Retrieved from <http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/view/26117>
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2011). Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. In *Current Protocols in Bioinformatics* (Vol. Chapter 10, p. Unit 10.7.). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
- Kumar, A., Ramanathan, A., & Prasad, M. (2016). Distribution, enrichment, and potential toxicity of trace metals in the surface sediments of Sundarban mangrove ecosystem, Bangladesh: a baseline study before. *Science and Pollution* Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s11356-016-6086-6>
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), 6955–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413450>
- Langille, M., Zaneveld, J., & Caporaso, J. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819121/>
- Lauber, C., Hamady, M., & Knight, R. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/75/15/5111.short>
- Lavieren, H. Van, Spalding, M., & Alongi, D. (2012). Securing the future of mangroves. *Policy Brief, UN Univ*. Retrieved from [https://www.files.ethz.ch/isn/156057/Securing the future of mangroves \(high res\).pdf](https://www.files.ethz.ch/isn/156057/Securing%20the%20future%20of%20mangroves%20(high%20res).pdf)
- Lebedeva, E., Off, S., & Zumbärgel, S. (2011). Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. *FEMS*. Retrieved from <http://femsec.oxfordjournals.org/content/75/2/195.abstract>
- Lee, S., & Primavera, J. (2014). Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: a reassessment. *Global Ecology and*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/geb.12155/full>
- Legendre, P., Borcard, D., & Peres-Neto, P. R. (2005). ANALYZING BETA DIVERSITY: PARTITIONING THE SPATIAL VARIATION OF COMMUNITY COMPOSITION DATA. *Ecological Monographs*, 75(4), 435–450. <https://doi.org/10.1890/05-0549>
- Lemos, L., Fulthorpe, R., & Triplett, E. (2011). Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701211001138>
- Li, W., Guan, W., Chen, H., Liao, B., Hu, J., Peng, C., ... He, Y. (2016). Archaeal communities in the sediments of different mangrove stands at Dongzhaigang, China.

- Journal of Soils and Sediments*, 16(7), 1995–2004. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1427-0>
- Liang, S., Zhou, R., Dong, S., & Shi, S. (2008). Adaptation to salinity in mangroves: Implication on the evolution of salt-tolerance. *Science Bulletin*, 53(11), 1708–1715. <https://doi.org/10.1007/s11434-008-0221-9>
- Ligi, T., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J.-K., Nõlvak, H., Mitsch, W. J., ... Truu, J. (2014). Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. *Ecological Engineering*, 72, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.09.007>
- Lodish, H. F. (2010). *Molecular cell biology*. W.H. Freeman. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>
- Lopes, L. D., Pereira E Silva, M. de C., & Andreote, F. D. (2016). Bacterial Abilities and Adaptation Toward the Rhizosphere Colonization. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01341>
- Lopes, L. D., Pereira E Silva, M. de C., & Andreote, F. D. (2016). Bacterial Abilities and Adaptation Toward the Rhizosphere Colonization. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01341>
- Lubsanova, D., Zenova, G., & Kozhevin, P. (2014). Filamentous Actinobacteria of the saline soils of arid territories. *Moscow University Soil*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.3103/S0147687414020057>
- Lundberg, D., Lebeis, S., Paredes, S., & Yourstone, S. (2012). Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. *Nature*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4074413/>
- Lv, X., Ma, B., Yu, J., Chang, S., Xu, J., Li, Y., & Wang, G. (2016). Bacterial community structure and function shift along a successional series of tidal flats in the Yellow River Delta. *Scientific*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5099912/>
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (n.d.). Biología de los microorganismos. 2004. Ed. Pearson Alhambra. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?q=Brock+Biología+de+los+Microorganismos+2004&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5
- Magurran, A. E. (2013). *Measuring Biological Diversity*. John Wiley & Sons.
- Marchand, C., Allenbach, M., & Lallier-Verges, E. (2011). Relationships between heavy metals distribution and organic matter cycling in mangrove sediments (Conception Bay, New Caledonia). *Geoderma*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706110003265>
- Maskow, T., & Babel, W. (2001). Calorimetrically obtained information about the efficiency of ectoine synthesis from glucose in Halomonas elongata. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416501001155>
- Mason, O., Hazen, T., Borglin, S., & Chain, P. (2012). Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3498917/>
- Mavi, M., Sanderman, J., & Chittleborough, D. (2012). Sorption of dissolved organic matter in salt-affected soils: Effect of salinity, sodicity and texture. *Science of the Total*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712009540>
- McAllister, S., Davis, R., & McBeth, J. (2011). Biodiversity and emerging biogeography of the neutrophilic iron-oxidizing Zetaproteobacteria. *Applied and*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/early/2011/06/10/AEM.00533-11.short>

- McMurdie, P., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article/figures?id=10.1371/journal.pone.0061217>
- Mendes, L., & Tsai, S. (2014). Variations of Bacterial Community Structure and Composition in Mangrove Sediment at Different Depths in Southeastern Brazil. *Diversity*, 6(4), 827–843. <https://doi.org/10.3390/d6040827>
- Mendes, L., Taketani, R., & Navarrete, A. (2012). Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. *Research in Microbiology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250812000642>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Mirete, S., Mora-Ruiz, M. R., Lamprecht-Grandío, M., de Figueras, C. G., Rosselló-Móra, R., & González-Pastor, J. E. (2015). Salt resistance genes revealed by functional metagenomics from brines and moderate-salinity rhizosphere within a hypersaline environment. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01121>
- Mnif, S., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2009). Isolation and characterization of Halomonas sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. *Journal of Applied Microbiology*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04251.x/full>
- Molero, G. C., & Novelli, Y. S. (1983). Introducción a la ecología del manglar. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=133607&indexSearch=ID>
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. *Revista de Biología Tropical*, 49(3–4), 1300–1302. Retrieved from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442001000300090
- Morgan, J. A. W., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1729–1739. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>
- Muegge, B., Kuczynski, J., & Knights, D. (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/332/6032/970.short>
- Muyzer, G., & Sorokin, D. (2011). Complete genome sequence of “Thioalkalivibrio sulfidophilus” HL-EbGr7. *Standards in*. Retrieved from <https://standardsingenomics.biomedcentral.com/articles/10.4056/sigs.1483693>
- Muyzer, G., & Waal, E. De. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/59/3/695.short>
- Naushad, S., Adeolu, M., Wong, S., & Sohail, M. (2015). A phylogenomic and molecular marker based taxonomic framework for the order Xanthomonadales: proposal to transfer the families Algiphilaceae and. *Antonie Van*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s10482-014-0344-8>

-
- Navarro-Noya, Y., & Luna-Guido, M. (2016). Cultivable Nitrogen Fixing Bacteria from Extremely Alkaline-Saline Soils. *Advances in*. Retrieved from http://file.scirp.org/Html/3-2270736_66455.htm
- Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., Fukami, T., O'Neill, S. P., Bilinski, T. M., Stanish, L. F., ... Ferrenberg, S. (2013). Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 77(3), 342–56. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00051-12>
- Nogueira, V. L. R., Rocha, L. L., Colares, G. B., Angelim, A. L., Normando, L. R. O., Cantão, M. E., ... Melo, V. M. M. (2015). Microbiomes and potential metabolic pathways of pristine and anthropized Brazilian mangroves. *Regional Studies in Marine Science*, 2, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2015.08.008>
- Odum, W., & Heald, E. (1975). The detritus-based food web of an estuarine mangrove community, p. 265–286 In LE Cronin (ed.), *Estuarine Research*, Vol. 1.
- Ofer, N., Wishkautzan, M., Meijler, M., Wang, Y., Speer, A., Niederweis, M., & Gur, E. (2012). Ectoine biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7483–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.01318-12>
- Oh, H., Kang, I., Vergin, K., Kang, D., & Rhee, K. (2011). Complete genome sequence of strain HTCC2503T of *Parvularcula bermudensis*, the type species of the order “Parvularculales” in the class alphaproteobacteria. *Journal of*. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/193/1/305.short>
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., & O'Hara, B. (2007). The vegan package. *Community Ecology*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Gavin_Simpson/publication/228339454_The_vegan_Package/links/0912f50be86bc29a7f000000.pdf
- Oliveira, V. de, Miranda, M., & Soares, M. (2015). Study of carotenoids in cyanobacteria by Raman spectroscopy. *Acta Part A: Molecular* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142515006332>
- Oren, A. (2014). The Family Xanthobacteraceae. *The Prokaryotes*. Retrieved from http://link.springer.com/10.1007%2F978-3-642-30197-1_258
- Oren, A., & Papke, R. (2010). Molecular phylogeny of microorganisms. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=a5t9DYZ-wccC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Oren,+A.,+%26+Papke,+R.+T.+\(2010\).+Molecular+phylogeny+of+microorganisms&ots=ekEbJPF1OO&sig=gHRgKO_hlYbvBOSSC2k22sT54qo](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=a5t9DYZ-wccC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Oren,+A.,+%26+Papke,+R.+T.+(2010).+Molecular+phylogeny+of+microorganisms&ots=ekEbJPF1OO&sig=gHRgKO_hlYbvBOSSC2k22sT54qo)
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
- Oulas, A., Pavloudi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., ... Iliopoulos, I. (2015). Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9, 75–88. <https://doi.org/10.4137/BBI.S12462>
- Parida, A. K., & Jha, B. (2010). Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. *Trees*, 24(2), 199–217. <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0417-x>
- Parks, D., Tyson, G., Hugenholtz, P., & Beiko, R. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. Retrieved from <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/30/21/3123.short>
- Paulson, J., Pop, M., & Bravo, H. (2013). metagenomeSeq: Statistical analysis for sparse high-throughput sequencing. *Bioconductor Package*. Retrieved from <http://bioconductor.riken.jp/packages/3.2/bioc/vignettes/metagenomeSeq/inst/doc/metagenomeSeq.pdf>
- Pepper, I. L., Gerba, C. P., & Gentry, T. J. (n.d.). *Environmental microbiology*.

- Peura, S., Eiler, A., Bertilsson, S., & Nykänen, H. (2012). Distinct and diverse anaerobic bacterial communities in boreal lakes dominated by candidate division OD1. *The ISME*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3498924/>
- Pevsner, J. (n.d.). *Bioinformatics and functional genomics*.
- Polanía, J., Vanegas, J., Galindo, T., & Pérez, Á. (2013). Grupos funcionales de microorganismos asociados al manglar del Caribe colombiano. *Red de Estudios Del* Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Jaime_Polania_Vorenberg/publication/259297942_Resena_de_los_aportes_de_la_sede_Medellin_de_la_Universidad_Nacional_de_Colombia_al_conocimiento_de_los_manglares_colombianos/links/00b7d52ae5e124a4c000000.pdf#page=9
- Poolman, B., Spitzer, J., & Wood, J. (2004). Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*-. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273604001609>
- Prevost-Boure, N., Dequiedt, S., & Thioulouse, J. (2014). Similar processes but different environmental filters for soil bacterial and fungal community composition turnover on a broad spatial scale. *PloS One*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0111667>
- Prosser, J. I. (2015). Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of “omics” in soil microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 13(7), 439–446. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3468>
- Prosser, J. I., Head, I. M., & Stein, L. Y. (2014). The Family Nitrosomonadaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 901–918). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_372
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., & Gerken, J. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids*. Retrieved from <https://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D590/1069277>
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1–2), 341–361. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9568-6>
- Rambaut, A. (2014). FigTree, A graphical viewer of phylogenetic trees and as a program for producing publication-ready figures. Retrieved June 1, 2017, from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rameshkumar, N., & Nair, S. (2009). Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres. *FEMS Microbiology Ecology*. Retrieved from <http://femsec.oxfordjournals.org/content/67/3/455.abstract>
- Ranjard, L., Dequiedt, S., & Jolivet, C. (2010). Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative. *Agronomy for*. Retrieved from http://www.agronomy-journal.org/articles/agro/full_html/2010/02/a9144/a9144.html
- Ranjard, L., & Richaume, A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250801012517>
- Ravikumar, S., Kathiresan, K., & Ignatiammal, S. (2004). Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. *Journal of Experimental*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098104003260>
- Reef, R., Feller, I. C., & Lovelock, C. E. (2010). Nutrition of mangroves. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq048>

- Rényi, A. (1961). On measures of entropy and information. *Berkeley Symposium on Mathematical Statistics* Retrieved from http://biocomparison.ucoz.ru/_ld/0/37_SjS.pdf
- Rietz, D., & Haynes, R. (2003). Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071703001251>
- Rigonato, J., Kent, A., & Alvarenga, D. (2013). Drivers of cyanobacterial diversity and community composition in mangrove soils in south-east Brazil. *Environmental*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2012.02830.x/full>
- Rodriguez-R, L. M., & Konstantinidis, K. T. (2014). Nonpareil: a redundancy-based approach to assess the level of coverage in metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 30(5), 629–635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt584>
- Rodriguez-R, L. M., & Konstantinidis, K. T. (2014). Estimating coverage in metagenomic data sets and why it matters. *The ISME Journal*, 8(11), 2349–2351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.76>
- Ryan, R., Vorhölter, F., & Potnis, N. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews*. Retrieved from <http://search.proquest.com/openview/ff03a818da44cf8e14346cad89536af7/1?pq-origsite=gscholar&cbl=27584>
- Sanschagrin, S., & Yergeau, E. (2014). Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons. *Journal of Visualized Experiments*, (90). <https://doi.org/10.3791/51709>
- Saum, S., & Müller, V. (2007). Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology*. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/189/19/6968.short>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Scholz, A., Stahl, J., Berardinis, V., & Müller, V. (2016). Osmotic stress response in *Acinetobacter baylyi*: identification of a glycine–betaine biosynthesis pathway and regulation of osmoadaptive choline uptake and glycine–. *Environmental*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1758-2229.12382/pdf>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Shiyan, A., Thompson, M., Köcher, S., & Tausendschön, M. (2014). Glutamine synthetase 2 is not essential for biosynthesis of compatible solutes in *Halobacillus halophilus*. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=x1uuCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA253&dq=Glutamine+synthetase+2+is+not+essential+for+biosynthesis+of+compatible+solute+in+Halobacillus+halophilus&ots=9MK6yvipyC&sig=4s1YJNI_XGHFYuy5VIC5Fa5rs0
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123–31. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Silva, A. Da, Ferro, J., Reinach, F., & Farah, C. (2002). KEYWORDS. SOURCE *Xanthomonas axonopodis* pv. citri str. 306 ORGANISM *Xanthomonas axonopodis* pv.

- citri str. 306 Bacteria; Proteobacteria; *Nature*. Retrieved from <http://prodigal.ornl.gov/genomes/AE008923.gbk>
- Simon, C., & Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/77/4/1153.short>
- Sinclair, L., Osman, O., Bertilsson, S., & Eiler, A. (2015). Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the illumina platform. *PloS One*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116955>
- Singh, R., Shelke, G., & Kumar, A. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Frontiers in*. Retrieved from <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00937/full>
- Slonczewski, J., & Foster, J. (2013). Microbiology: An Evolving Science: Third International Student Edition. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=xUreCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=Slonczewski++Foste+2013&ots=kqmKqilWHW&sig=JprzwznGS7u15MTApAT94gNS8UE>
- Smith, S. E., Read, D. J., Smith, S. E., & Read, D. J. (2002). INTRODUCTION. In *Mycorrhizal Symbiosis* (pp. 1–8). <https://doi.org/10.1016/B978-012652840-4/50001-2>
- Sorokin, D., Berben, T., Melton, E., & Overmars, L. (2014). Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00792-014-0670-9>
- Soto-Ramírez, N., & Sanchez-Porro, C. (2007). Halomonas avicenniae sp. nov., isolated from the salty leaves of the black mangrove Avicennia germinans in Puerto Rico. *Of Systematic and* Retrieved from <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ij.0.64818-0>
- Spalding, M., Kainuma, M., & Collins, L. (2010). *World atlas of mangroves*. Earthscan. Retrieved from https://books.google.com.co/books/about/World_Atlas_of_Mangroves.html?id=wzSCKuIW9SQC&redir_esc=y
- Starr, M., Stolp, H., Trüper, H., Balows, A., & Schlegel, H. (2013). The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=RpPuCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=The+prokaryotes:+a+handbook+on+habitats,+isolation+and+identification+of+bacteria&ots=F6zOqJh-0V&sig=UVu9crzvDTis_Ulyesp0jgkCSfw
- Takaki, Y., Shimamura, S., & Nakagawa, S. (2010). Bacterial lifestyle in a deep-sea hydrothermal vent chimney revealed by the genome sequence of the thermophilic bacterium *Deferribacter desulfuricans* SSM1. *DNA*. Retrieved from <http://dnaresearch.oxfordjournals.org/content/early/2010/02/26/dnares.ds005.abstract>
- Thatoi, H., Behera, B. C., Mishra, R. R., & Dutta, S. K. (2013). Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Annals of Microbiology*, 63(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0442-7>
- Tripathi, S., Kumari, S., Chakraborty, A., & Gupta, A. (2006). Microbial biomass and its activities in salt-affected coastal soils. *Biology and Fertility of*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00374-005-0037-6>
- Turan, S., Cornish, K., & Kumar, S. (2012). Salinity tolerance in plants: breeding and genetic engineering. *Australian Journal of Crop*. Retrieved from <http://search.proquest.com/openview/5de0f49ce897e79cfcc740ee9a7fb8d2/1?pq-origsite=gscholar&cbl=52462>

- Ukpong, I. (1997). Vegetation and its relation to soil nutrient and salinity in the Calabar mangrove swamp, Nigeria. *Mangroves and Salt Marshes*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1009952700317>
- US EPA, O. (n.d.). Mangrove Swamps. Retrieved from <https://www.epa.gov/wetlands/mangrove-swamps>
- Ventura, M., Canchaya, C., & Tauch, A. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and*. Retrieved from <http://mmbr.asm.org/content/71/3/495.short>
- Venugopal, M., & Saramma, A. (2006). Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305005350>
- Verna, C., Ramette, A., & Wiklund, H. (2010). High symbiont diversity in the bone-eating worm *Osedax mucofloris* from shallow whale-falls in the North Atlantic. *Environmental*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2010.02299.x/full>
- Villarreal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., & Fagua, G. (2006). Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. *Manual de Métodos Para El*.
- Wang, Z., Guo, F., Liu, L., & Zhang, T. (2014). Evidence of carbon fixation pathway in a bacterium from candidate phylum SBR1093 revealed with genomic analysis. *PLoS One*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109571>
- Ward, B., Arp, D., & Klotz, M. (2011). Nitrification. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=_QmsBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT22&dq=Ward+.+\(2011\).+Nitrification&ots=2qUBuzsOMg&sig=55M1fkp6aSxvQozIHJTO7OB5s](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=_QmsBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT22&dq=Ward+.+(2011).+Nitrification&ots=2qUBuzsOMg&sig=55M1fkp6aSxvQozIHJTO7OB5s)
- Weiss, C., Weiss, J., Boy, J., Iskandar, I., Mikutta, R., & Guggenberger, G. (2016). Soil organic carbon stocks in estuarine and marine mangrove ecosystems are driven by nutrient colimitation of P and N. *Ecology and Evolution*, 6(14), 5043–56. <https://doi.org/10.1002/ece3.2258>
- Williams, K. P., Sobral, B. W., & Dickerman, A. W. (2007). A Robust Species Tree for the Alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4578–4586. <https://doi.org/10.1128/JB.00269-07>
- Williams, M., & Rice, C. (2007). Seven years of enhanced water availability influences the physiological, structural, and functional attributes of a soil microbial community. *Applied Soil Ecology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139306002162>
- Wu, P., Xiong, X., Xu, Z., Lu, C., Cheng, H., Lyu, X., ... Gomes, N. (2016). Bacterial Communities in the Rhizospheres of Three Mangrove Tree Species from Beilun Estuary, China. *PLOS ONE*, 11(10), e0164082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164082>
- Yao, L., Wu, Z., Zheng, Y., Kaleem, I., & Li, C. (2010). Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology*, 46(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.11.002>
- Yuan, B., Li, Z., Liu, H., Gao, M., & Zhang, Y. (2007). Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. *Applied Soil Ecology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139306001685>

-
- Zhalnina, K., Dias, R., & Quadros, P. de. (2015). Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microbial Ecology*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00248-014-0530-2>
- Zhang, Z., Xu, X., Sun, Y., Yu, S., & Chen, Y. (2014). Heavy metal and organic contaminants in mangrove ecosystems of China: a review. *Science and Pollution* Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3100-8>
- Zhou, J., Wu, L., Deng, Y., Zhi, X., Jiang, Y., & Tu, Q. (2011). Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection. *The ISME*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3146266/>
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D., & Wu, L. (2002). Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and*. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/68/1/326.short>